

T.C
YÜZÜNCÜ YIL ÜNİVERSİTESİ
SAĞLIK BİLİMLERİ ENSTİTÜSÜ

BABESİOSİSLİ KOYUNLARDA SERUM PROTEİNLERİNİN
ELEKTROFORETİK İNCELENMESİ

Veteriner Hekim Betül APAYDIN
BİYOKİMYA ANABİLİM DALI
YÜKSEK LİSANS TEZİ

DANIŞMAN
Doç. Dr. Semiha DEDE

VAN-2006

T.C
YÜZÜNCÜ YIL ÜNİVERSİTESİ
SAĞLIK BİLİMLERİ ENSTİTÜSÜ

BABESİOSİSLİ KOYUNLARDA SERUM PROTEİNLERİNİN
ELEKTROFORETİK İNCELENMESİ

Veteriner Hekim Betül APAYDIN
BİYOKİMYA ANABİLİM DALI
YÜKSEK LİSANS TEZİ

Jüri Başkanı

Prof. Dr. Nihat MERT

Üye

Prof. Dr. İsmail MERAL

Üye

Doç. Dr. Semiha DEDE

TEZ KABUL TARİHİ

14/ 09/ 2006

TEŞEKKÜR

Yüksek Lisans çalışmalarım sırasında beni yönlendiren, her türlü desteğini esirgemeyen, değerli danışmanım Sayın Doç. Dr. Semiha DEDE'ye, yüksek lisans eğitimimde benden yardımlarını esirgemeyen Sayın Prof. Dr. Nihat MERT, Prof. Dr. Fatmagül YUR, Doç. Dr. Yeter DEĞER, Doç. Dr. Handan MERT ve Doç. Dr. Ali ERTEKİN'e ve araştırma görevlisi arkadaşlarıma, paraziter muayenedeki değerli yardımlarından dolayı sayın hocam Prof. Dr. Serdar DEĞER'e, elektroforetik analizlerdeki yardımlarından dolayı Prof. Dr. Ramazan ŞEKEROĞLU'na ve Biyokimya Teknikeri Metin YAŞAR'a, materyallerin sağlanmasında değerli yardımlarını esirgemeyen Veteriner Hekim Özay İLHAN'a ve son olarak beni yetiştiren ve benden her türlü desteklerini esirgemeyen annem, babam, ablam Özlem ve kardeşim Aydın'a teşekkürlerimi sunarım.

İÇİNDEKİLER

Kabul ve Onay	II
Teşekkür	III
İçindekiler	IV
Simgeler ve Kısaltmalar	VI
Şekiller	VII
Tablolar	IX
1.GİRİŞ	1
2.GENEL BİLGİLER	2
2.1.Babesiosis	2
2.1.1. Tarihçe	3
2.1.2. Etiyoloji	3
2.1.3. Epidemiyoloji	4
2.1.4. Patogenez	4
2.1.5. Semptomlar	5
2.1.6. Nekropsi	6
2.1.7. Tanı.....	7
2.1.8. Tedavi	7
2.1.9. Korunma	8
2.2. Proteinler	8
2.2.1. Protein Sınıfları	8
2.2.2. Serum Proteinleri	9
2.2.2.1. Prealbumin	10
2.2.2.2. Albumin	10
2.2.2.3. α_1 -Globulin	11
2.2.2.4. α_2 -Globulin	11
2.2.2.5. β -Globulin	12
2.2.2.6. γ -Globulin	12
2.2.3. Elektroforez	13
2.2.4. Elektroforez Çeşitleri	14

2.2.5. Elektroforez Kullanım Alanları	17
2.2.6. Çeşitli Hastalıklarda Serum Protein Fraksiyonları.....	17
3. MATERYAL VE METOT	22
3.1. Materyal	22
3.1.1. Hasta Materyali	22
3.1.2. Kullanılan Alet ve Kimyasal Maddeler	23
3.2. Metot	24
3.2.1. Selüloz Asetat Elektroforezi ile Serum Proteinlerinin Analizi	24
3.2.2. Serum Protein Analizi (Biüret Metodu)	25
3.2.3. İstatistik Analiz	27
4. BULGULAR	28
5. TARTIŞMA VE SONUÇ	38
ÖZET	44
SUMMARY	45
KAYNAKLAR	46
ÖZGEÇMİŞ	51

SİMGELER VE KISALTMALAR

Alb	: Albumin
A/G	: Albumin/Globulin
α	: Alfa
CuSO₄	: Bakır sülfat
β	: Beta
dl	: Desilitre
ELISA	: Enzyme Linked Immun Assay
γ	: Gama
g	: Gram
IgA	: İmmunglobulin A
IgD	: İmmunglobulin D
IgE	: İmmunglobulin E
IgG	: İmmunglobulin G
IgM	: İmmunglobulin M
im	: İntra muskuler
kg	: Kilogram
μm	: Mikrometre
mg	: Miligram
ml	: Mililitre
M	: Molar
Nm	: Nanometre
N	: Normal
PCR	: Polymerase Chain Reaction (Polimer Zincir Reaksiyonu)
KI	: Potasyum iyodür
°C	: Santigrat derece
SDS-PAGE	: Sodium Dodecyl Sulphate Polyacrylamide Gel Electrophoresis
NaOH	: Sodyum hidroksit
NaCl	: Sodyum klorür
SX	: Standart sapma
sc	: Subkutan
TP	: Total Protein

ŞEKİLLER

Şekil 1. <i>Babesia</i> 'nın biyolojisi	5
Şekil 2. Selüloz asetat elektroforezi ile elde edilen protein bantları	10
Şekil 3. Selüloz asetat elektroforezi ile elde edilen protein fraksiyonları	15
Şekil 4. Çeşitli hastalık durumunda selüloz asetat elektroforezi ile elde edilen protein fraksiyonları.....	20
Şekil 5. Kontrol grubunda sellüloz asetat ile elde edilen elektroforezdeki protein fraksiyonları	31
Şekil 6. Kontrol grubunda sellüloz asetat ile elde edilen elektroforezdeki protein fraksiyonlarının dansitometrik görünüşleri	31
Şekil 7. Hasta grupta sellüloz asetat ile elde edilen elektroforezdeki protein fraksiyonları.....	32
Şekil 8. Hasta grupta sellüloz asetat ile elde edilen elektroforezdeki protein fraksiyonlarının dansitometrik görünüşleri	32
Şekil 9. Tedavi grubunda sellüloz asetat ile elde edilen elektroforezdeki protein fraksiyonları	33
Şekil 10. Tedavi grubunda sellüloz asetat ile elde edilen elektroforezdeki protein fraksiyonlarının dansitometrik görünüşleri	33
Şekil 11. Kontrol grubu ile hasta ve tedavi sonrası gruptaki ortalama TP düzeylerinin karşılaştırılması	34
Şekil 12. Kontrol grubu ile hasta ve tedavi sonrası gruptaki ortalama albumin düzeylerinin karşılaştırılması	34
Şekil 13. Kontrol grubu ile hasta ve tedavi sonrası gruptaki ortalama α -globulin düzeylerinin karşılaştırılması	35
Şekil 14. Kontrol grubu ile hasta ve tedavi sonrası gruptaki ortalama α_2 -globulin düzeylerinin karşılaştırılması	35
Şekil 15. Kontrol grubu ile hasta ve tedavi sonrası gruptaki ortalama β -globulin düzeylerinin karşılaştırılması	36

Şekil 16. Kontrol grubu ile hasta ve tedavi sonrası gruptaki ortalama γ -globulin düzeylerinin karşılaştırılması	36
Şekil 17. Kontrol grubu ile hasta ve tedavi sonrası gruptaki ortalama Alb/Glb düzeylerinin karşılaştırılması	37

TABLÖLAR

Tablo 1. Babesiosis sağıaltımında kullanılan ilaçlar	7
Tablo 2. Protein fraksiyonlarının bileşimi	10
Tablo 3. Erişkin hayvanlarda normal serum globulin konsantrasyonları	12
Tablo 4. Bazı serum protein fonksiyonları ve çeşitli hastalıklardaki değışimleri	21
Tablo 5. Kontrol grubu ile babesiosisli hasta ve tedavi gruplarındaki protein fraksiyon konsantrasyonları	28
Tablo 6. Protein fraksiyonlarının % g'a çevrilmeleri sonucunda elde edilen değerler..	30

1. GİRİŞ

Kenelerin aktif olduğu yaz aylarında theileriosis, babesiosis ve anaplasmosis vakalarına ÷lkemizde sıklıkla rastlanılmaktadır. Bu hastalıklardan babesiosis bir protozoon hastalığı olmakla beraber tropik, subtropik ve hatta ılıman bölgelerde yaygın olarak görülür. ÷lkemizde ise sığır, koyun ve keçilerde gör÷lmekte ve büyük ekonomik kayıplara neden olmaktadır (1, 2).

Kandaki azotlu maddeler, organik ve inorganik N içeren bileşiklerden oluşur. Bunların içinde proteinler önemli yer tutarlar. Farklı çöktürme teknikleri ile kanda albumin, globulin, fibrinojen gibi proteinler saptanırken, elektroforetik tekniklerin gelişmesiyle 20’den fazla protein ayırt edildi. Böylelikle proteinlerin yapıları, hastalıklarla ilişkileri açıklandı (3).

Canlı hücrelerin önemli komponentleri olan proteinler, hidrolize olduklarında aminoasitlere parçalanırlar. Çok sayıda aminoasit yan yana dizilip bir birine peptid bağları ile bağlanırsa, zincir uzunluğu 100–1000 aminoasit tarafından teşkil edilen, molekül kütleleri 10.000’den 100.000’in üzerinde proteinler meydana gelir. “Protein” kelimesi, Berzelius tarafından kuruldu ve ilk defa (1840) Mulder’in kitabında kullanılarak, yunancada “ilk planda yer alırım” anlamına gelen, proteuo kelimesinden türetildi (4).

Elektroforez, yüklü partiküllerin bir elektrik akımının etkisi ile birbirlerinden ayrılması olayıdır (5). Bir iyonun göç hızı, tatbik edilen elektrik akımına, iyonun büyüklüğüne, şekline ve elektrik yüküne bağlıdır (6). Sıcaklık, pH, kullanılan tampon, akışkanlık, elektriksel alanın şiddeti, iyonik güç, sürtünme katsayısı, molekülün kimyasal yapısı, net yük, büyüklük ve akımın cinsi moleküllerin göç hızını etkiler (7).

÷lkemizde yaygın olarak bulunan kan parazitleri, tarıma dayalı ekonomi açısından önemli kayıplara yol açmaktadır. Bu çalışmada babesiosisli koyunlarda serum protein düzeyleri ve proteinlerin elektroforetik ayrımı yapılarak, albumin, α_1 , α_2 , β , γ -globulin ve bantlarının saptanması ve değışkenliği araştırıldı.

2. GENEL BİLGİLER

Ülkemizde çok yaygın olan paraziter hastalıklar ile ilgili pek çok yayın yapıldı. Türkiye ekonomisine büyük darbeler vuran bu hastalıklardan korunmak için tanı ve özellikle erken teşhis oldukça önemlidir. Yıllardır yoğun olarak devam eden hayvan hareketleri ve hüküm süren farklı iklim koşulları nedeniyle parazitlerin gelişimi için uygun bir ortam olan Türkiye’de, evcil hayvanlarda endoparazitlere bağlı olarak meydana gelen paraziter invazyonlara çok sık rastlanılmaktadır (8–10).

Sahip olduğu yüksek koyun popülasyonu ile dünya ülkeleri arasında üst sıralarda yer alan ülkemiz için koyun yetiştiriciliği büyük ekonomik önem taşır. Paraziter invazyonlar koyun yetiştiriciliğinde et, süt, deri ve yapağı verimini düşürmekte, dolayısıyla ülke ekonomisi büyük zarar görmektedir (11).

Günümüzde paraziter hastalıkların erken teşhisinde rutin parazitolojik muayenelerin yanında, konakçının biyokimyasal yapısında meydana gelen bazı değişikliklerin tespiti ve serolojik testlerden yararlanılmaktadır.

2.1. Babesiosis

Kan emen kenelerle bulaştırılan ve *Babesia* türü protozoalar tarafından meydana getirilen bir protozoon hastalığıdır. *Babesia* soyu *Piroplasmida* dizisinin *Babesidae* ailesi içerisinde yer alan hücre içi parazitlerdir. Bütün *Piroplasmida* dizisindeki etkenlerin yaptıkları enfeksiyonlara piroplasmosis adı verilir. Sığırlarda yaşayan *Piroplasma*’ları ilk defa Babés’in keşfetmesinden dolayı, sebep oldukları enfeksiyonlara babesiosis adı verilir (12, 13).

Koyun ve keçilerin *Babesidae* enfeksiyonları dünyanın çeşitli bölgelerinde “carceag”, ictero-hematuria, “jaunise”, “koyunların malaryal kataral humması” ve “haemoglobinuria” gibi adlar alır. Türkiye’de halk arasında koyun ve keçilerin piroplasmosis ve babesiosis’ine “ağrı”, “ağrık”, “ağrıma”, “sıtma”, “kırça” denmektedir (13).

2.1.1. Tarihçe

Piroplasmida'lar ilk defa 1888 yılında Romanya sığırlarında Babés tarafından keşfedildi. 1892'de yine Babés, koyunlarda enzootik hemoglobinüriye sebep olan etkenlerin kenelerle nakledildiklerini buldu. Türkiye'de 1890'da Nicole ve Adil, sığır piroplasmaları üzerinde etütler yaptı. 1899'da Guglielmi, İtalya'da atlardaki *Piroplasmaları* keşfetti. 1900'de Ligniéres Arjantin'de aynı etkenleri buldu. Koch 1904'de, alyuvarlarda basil şeklinde parazitler gördü ve *Piroplasma bigeminum*'un genç şekilleri olarak kabul etti. Gonder, Nuttall, Graham, Sergent ve arkadaşları, Yakimoff ve arkadaşları bu etkenlerin sistem, biyoloji, bağışıklık ve tedavileri üzerinde çalışmalar yaptı. Sözü edilen bu etkenler *Babesidae*, *Theileridae* ve *Anaplasmodae* ailelerinde toplandı (14).

Babesia etkenleri koyun ve keçilerin alyuvarlarında bulunur. *Piroplasma ovis*'i Lestoquard, Cezayir'de; Dschunkowsky ve Luhs Kafkasya'da; Inchiostri, Dalmaçya'da tespit ettiler. Enigk (15), Almanya'da koyunlarda *Babesia motasi* ve *Theileria recondita*'yı tespit etti. *P. ovis* Güney Avrupa, Akdeniz ülkeleri, Afrika, Rusya, Asya ve diğer tropik ve subtropik bölgelerde rastlanmaktadır. Yurdumuzda Tüzdil (16), Özcan (17) ve Göksu (18) tarafından yapılan araştırmalara göre babesiosis yerli koyun ve keçilerde daha sık görüldü.

2.1.2. Etiyoloji

Babesiosis koyun ve keçilerde *B. ovis* ve *B. motasi* tarafından meydana getirilen, akut, subakut veya latent seyreden, mevsime bağlı protozoer bir hastalıktır. *Babesiaların* vektörleri 1, 2, 3 konakçılı kenelerdir. Bunlar *Boophilus spp.*, *Hyalomma spp.*, *Rhipicephalus spp.*, *Haemophysalis spp.*, *Dermacentor spp.* ve *Ixodes spp.* 'dir. Ülkemizde *B. ovis* ve *B. motasi*'den ileri gelen babesiosis olguları Van ve yöresinde saptandı. *B. ovis*, 1–1.5x2.5 µ büyüklükte, yuvarlak, oval veya armut şeklinde eritrosit içinde tek veya çift olarak bulunur. *R. bursa*, *I. ricinus* ve *D. reticulatus* başlıca vektörleridir. *B. motasi*, 2.5-5x 2.5 µ büyüklükte, daha çok eritrosit içinde armut formunda bulunur. *Haemophysalis spp.* ve *Rhipicephalus spp.* türü keneler ile bulaşır (2, 12).

2.1.3. Epidemiyoloji

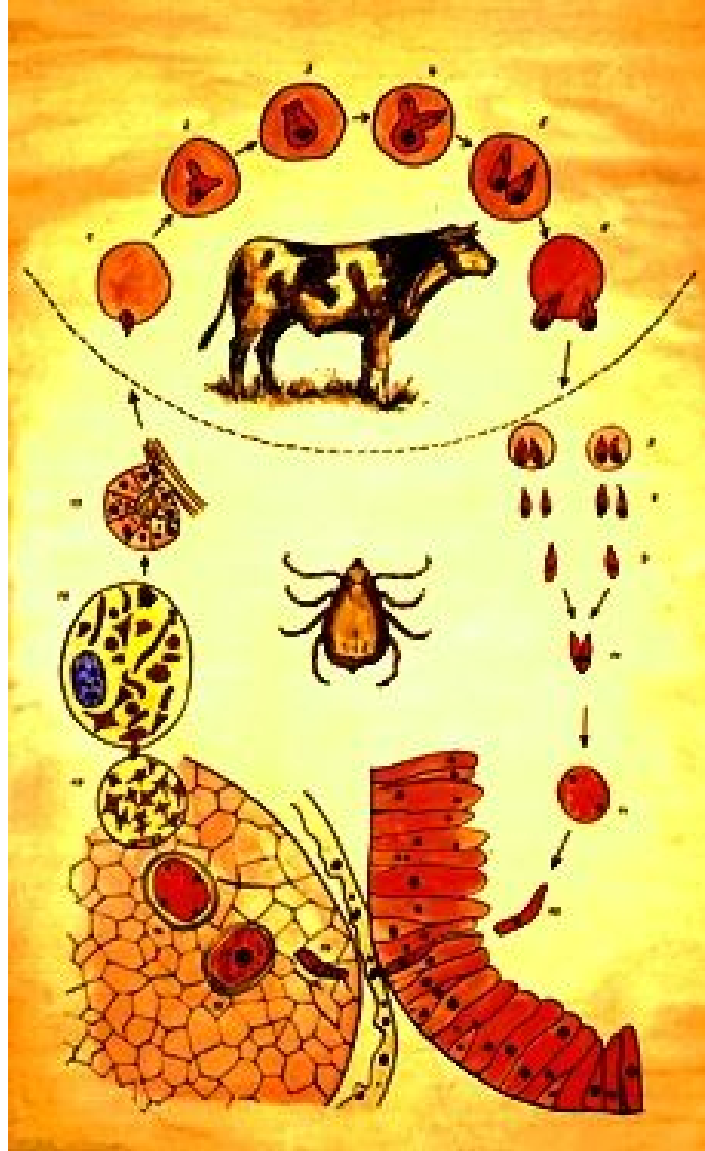
Hastalığın bulaşması ve insidensi kenelerin aktivitesiyle yakından ilgilidir. Keneler rutubetli ortamda ve 26–27 °C’de çok aktiftirler (2).

Genellikle koyun, keçi *Babesidae* enfeksiyonları her ırk ve her yaştaki hayvanlarda görülür. Fakat hastalık koyun ve keçilerde şiddetli, kuzu ve oğlaklarda hafif olarak görülür. Hastalık Orta Anadolu’da Haziran ve Temmuz aylarında enzootik bir durum gösterir. Koyunların babesiosisi Makedonya’da da aynı şekilde seyreder (19).

2.1.4. Patogenezi

Babesialar kenelerde transovarial ve transtadial olarak nakledilir. Şekil 1’de belirtildiği gibi hasta veya latent enfekte hayvanların kanından alınan *Babesia* etkenleri, kenelerin sindirim kanalında serbest hale geçerek bağırsak epitellerine yerleşir ve çoğaldıktan sonra, karın boşluğuna dökülerek tükürük bezlerine ve ovaryumlara göç ederler. Ovaryumlarda bulunan yumurtalara geçerek nimfleri enfekte ederler. Tükürük bezleri yoluyla kan emerken sağlıklı koyun ve keçileri de enfekte ederler. Perifer kana ulaşan etkenler eritrositler içine yerleşerek ikiye bölünerek çoğalırlar ve eritrositleri hemolize ederler. Hemolize bağlı olarak şiddetli anemi, hemoglobinemi, hemoglobinüri ve ikterus oluşur. Hastalığın akut dönemini atlatan koyun ve keçilerde *Babesialar* hemapoetik organlara yerleşerek *Babesia*’ya has bağışıklık (premunite) oluşumuna neden olurlar. Premunite gelişmiş hayvanların eritrositlerinde tek tük *Babesia* saptanabilir (12, 20).

Enfeksiyonu geçirenler bağışıklık kazandığı için, endemik bölgelerde özellikle kuzu ve oğlaklar kolostrumla yeterince antikor alırlarsa enfeksiyona dayanıklı olurlar. Enfeksiyonu alsalar bile çok hafif atlatarak aktif bağışıklık kazanırlar. Bu bağışıklık eğer enfeksiyon nükseder ise kalıcı olur. Başlangıçta etkili bir sağaltım uygulanmışsa, bağışıklık oluşmadan protozoonlar hastanın kanında bir süre kalır, ondan sonra kaybolurlar. Bu süre 6 ay kadardır, 6 ay boyunca hayvan tekrar duyarlı hale gelir. Bir yıllık devre hastalığın gizli seyrettiğini gösterir (1, 21).



Şekil 1. *Babesia*'nın biyolojisi (20).

2.1.5. Semptomlar

Babesiosis akut, subakut ve kronik seyirli olmakla beraber, pratik koşullarda ateş, anemi, ikterus, ödem ve hemoglobinüri ile karakterize akut formu görülür (12).

Doğal enfeksiyonlarda 8–10 günlük bir inkübasyon döneminden sonra vücut sıcaklığı aniden 41–42°C'ye kadar yükselir ve genellikle 5–6 gün süreyle yüksek kalır. Bu dönemde durgunluk, iştahsızlık, kalp frekansı ve solunum sayısında artış, süt veriminde gerileme gibi semptomlar ortaya çıkar. *B.motasi* hafif derecede ateşe neden olur. *B.ovis* koyun ve keçilerde görülen daha küçük protozodur (2, 12).

Hastalığın başlangıcından 2–5 gün sonra hemoglobinüri görülür. İdrar sarı kızılımtırak-şarap kırmızısı renktedir. Koyunlarda hemoglobinüri nispeten hafiftir. Hastalığın başlangıcında hiperemik olan görülebilir mukozalar ve konjunktivalar anemik ve ikterik bir görünüm alır (hemolitik icterus). Anemiye bağlı olarak yatma isteği, güçlkle hareket etme, yavaş ve sallantılı yürüyüş, sürünün gerisinde kalma, merada otlamama, çevreyle ilgisizlik, başlarını eğik tutma gibi genel bitkinlik semptomları görülür. Gebe koyun ve keçiler yavru atar. 7–10 gün içinde anemiden ölüm şekillenir. Kıllar ve yapağı normal durumlarını kaybeder, karışık bir hal alır. Piroplazmozun seyri esnasında karaciğer yetmezlikleri, karaciğerin perküsyon sahasında büyüme, ön midelerde atoni ve konstipasyon görülür (2, 12).

Genç hayvanlarda enfeksiyon subakut seyreder, hafif ateş görülmesine karşın, hemoglobinüri yoktur. Subakut ve kronik babesiosis olgularında sadece ateş ve iştahsızlık görülür. Kronik olaylar akut veya subakut olayların devamı sonucu olabilir veya başlangıçtan itibaren kronik seyirlidir. Kronik formlar genellikle zayıflamaya neden olur. Hematolojik bulgular olarak; kan sulu kıvamda, iyi pıhtılaşmaz, plazmada kızılımtırak renk gözlenir. Eritrosit sayısı ve hemoglobin miktarı azalır (2, 21).

2.1.6. Nekropsi

Anemi (kaslar solgun), ikterus (deri altı, yağ doku ve serozalar sarı), seroza ve mukozalarda peteşiel kanamalar, karaciğer büyümesi, böbreklerde degenerasyon, idrar kesesinde kırmızı renkte idrar bulunur. Safra kesesi çok dolgun, safra koyu renktedir. Kronik seyrinde zayıflama, anemi ve vücut boşluklarında transudat birikimi gözlenir (2).

Dalak büyümüş, şişmiş ve kıvamı yumuşaktır. Böbrekler büyümüş ve rengi koyudur. Ayrıca glomerulonefritis bulguları gözlenir. Epikard altında ve endokartta ekimotik kanamalar, perikardial kesede fazla miktarda kanlı bir sıvı tesbit edilir (21).

Akciğerde ödemler ve küçük kanama odakları bulunur; rengi grimsi pembedir. Trachea ve bronşlarda köpüklü bir sıvı vardır. Bronşial ve mediastial lenf yumruları hafifçe büyümüş ve kesit yüzleri irinlidir. Abomazumda müköz membran kırmızı renkte olup, küçük kanamalar vardır. Bağırsakların ve bazen de kolonların mukozası hafif hiperemik, bazen hemorajik ve şişkin görünüştedir (13).

2.1.7. Tanı

Hastalığın akut fazında periferik kandan hazırlanan sürme kan frotilerinin Giemsa ile boyanması ve mikroskopik muayenesinde *Babesialar* görülerek tanı konur. Karaciğer ve kalp kapillar kanından yapılan frotiler ölümden sonra 8. saate kadar iyi sonuçlar verir. Ancak subklinik olguların tanısında farklı serolojik testler ve PCR gibi ileri tanı teknikleri kullanılır. *B. ovis* seroprevalansı ELISA yöntemi ile saptanır. Vektör kenelerde *Babesiaların* değişik gelişme siklusları steromikroskop altında yapılan diseksiyondan elde edilen iç organlarından hazırlanan sürme frotilerinin, Giemsa ile boyanması ve immersiyon objektifte muayenesine dayanır. Ayırıcı tanıda, anemi ve ikterus semptomlarıyla seyreden leptospirosis, basiller iktero-hemoglobinüri, antraks, puerperal ikterohemoglobinüri, anaplasmosis ve theileriosis gibi hastalıklar dikkate alınmalıdır (2, 12).

2.1.8. Tedavi

Mümkün olduğu kadar erken dönemde sağaltımda kullanılan spesifik ilaçlardan biri kullanılmalıdır. İleri derecede anemi şekillenmiş, genel durumu iyice bozulmuş ise koyun ve keçilerde sağaltım şansı yoktur. Kesim önerilmelidir. Babesiosis sağaltımında kullanılan Tablo 1'deki antiprotozoer ilaçların yanısıra oksitetrasiklinler, kan yapıcı ilaçlar ve karaciğer koruyucular kullanılmalıdır (12).

Tablo 1. Babesiosis sağaltımında kullanılan ilaçlar (12).

Acridin deriveleri	Acriflavin hydrochlorid (Euflavin, trypaflavin)
Qiamidine deriveleri	Aromatik: Diminazene diaceturate (Berenil), pentamidin, diisethionate. Carbanilid: Amicarbalide
Quinoline deriveleri	Quinuronium sulfate (Acaprin, Babesan), trypanblue
Diminazene diaceturate. İmidocarb (1–3 mg/kg)	3–5 mg/kg, im veya sc.

2.1.9. Korunma

Sürü bazında kene mücadelesi şarttır. Kenelerin aktivite kazandıkları sıcak mevsimlerin başlangıcında (Mayıs sonu) kene banyosu, yıkama veya püskürtme şeklinde ilaçlama şarttır. Meraya çıkan hayvanlarda Flumethrin kullanılır. Ektoparaziter ilaç uygulamaları 4–6 hafta ara ile tekrarlanır. Koyun ve keçiler açısından ideal olanı Mayıs ayında kırkım sonrası yaptırılan kene banyosudur (12).

2.2. Proteinler

Proteinler, amino asitlerin (20 çeşit), peptit bağı adı verilen kovalent bağlarla birleşmesi sonucunda oluşan polipeptitlerdir (22). Hücrede çeşitli fonksiyonları yerine getirmek için özelleşmiş pek çok farklı tipte protein bulunur. Bu makromoleküller, hücrenin kuru kütlesinin en az % 10-20'sini oluştururlar (23).

Bir proteini meydana getiren amino asit dizisinin sıralanışına, o proteinin birincil (primer) yapısı adı verilir. İkincil (sekonder) yapı ise, polipeptit zincirinin, komşu amino asitlerin yan zincirlerindeki gruplar arasında kurulan hirojen köprüleri sonucu kazandığı yapıdır. Amino asitler çeşitli grupları aralarında peptit bağından başka değişik türde bağlar da kurarlar. Bu bağlar sayesinde, polipeptit zinciri katlanarak üç boyutlu konformasyon kazanır. Bu konformasyonlar, peptit zincirlerinin oluşturabileceği en kararlı, en sağlam şekle ve erişebilecekleri en düşük enerji düzeyine karşılık gelmektedir. Peptit zinciri, elektriksel olarak nötr olduğu pH değerinde α -sarmal yapı oluşturur. α -sarmalın yanısıra diğer bir sekonder yapı tipine β -konformasyon adı verilir. Üçüncül (tersiyer) yapı, polipeptit zincirlerinin uzak bölümlerindeki grupların birbirleriyle kurdukları (S-S, hidrojen, Van der Waals bağları ya da iyonik bağlar gibi) bağlar sonucu oluşan özgün, küresel yapı düzenidir. Dördüncül yapının oluşumunda moleküllerin asimetric yapıları ve alt birimlerin birbirlerini tümleyen (komplementer) yüzeyleri belirleyici olur (24).

2.2.1. Protein Sınıfları

Proteinler, hücredeki işlevleri açısından yapısal proteinler ve biyolojik olarak aktif proteinler olmak üzere iki sınıfa ayrılırlar. Suda çözünmeyen yapısal proteinler

(kollagen, elastin, keratin gibi), hücrenin oluşumunda yapıtaşı olarak bulunurlar. Biyolojik olarak aktif proteinlerde özgün üç boyutlu yapıları sayesinde molekülleri tanıma, onlarla etkileşerek hücredeki olaylara yön verme etkinliğine sahiptirler. Bu proteinler; katalitik proteinler (enzimler), immun proteinler, protein hormonlar, düzenleyici proteinler, taşıyıcı proteinler, reseptör proteinler ve kontraktıl proteinler olmak üzere çeşitli gruplara ayrılırlar (25).

2.2.2. Serum Proteinleri

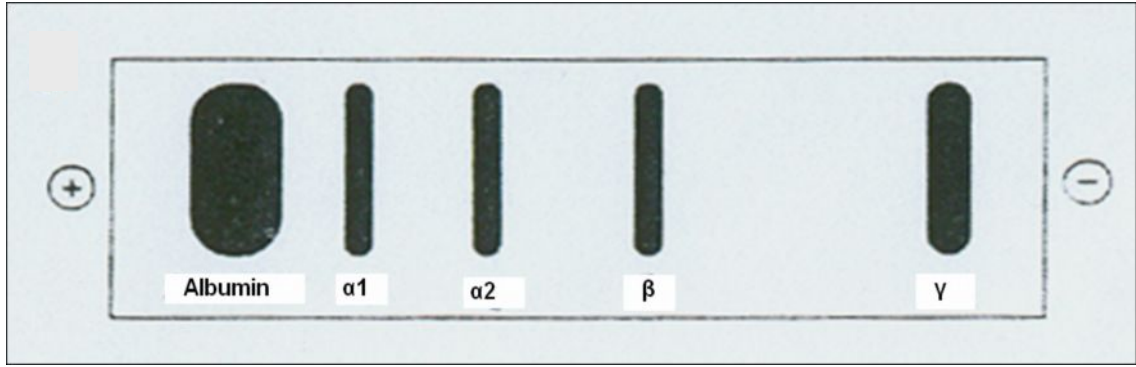
Serumda 20'nin üstünde protein olduğu bilinmektedir. Bu proteinler molekül ağırlıkları birkaç bin ile birkaç milyon dalton arasında değişen moleküllerdir. Her birinin değişik görevleri vardır. Değişik fizyolojik ve patolojik durumlarda serumda değişik miktarlarda bulunur. Serum proteinleri çok sayıda fizyolojik fonksiyonları yerine getirirler. Lipidler, hormonlar, vitaminler ve metaller için taşıyıcı moleküller olarak işlev yaparlar. Ozmotik basıncın sağlanmasında yardımcı olurlar. Hücre aktivitesinin düzenlenmesi, enfeksiyonlara karşı savunmada önemli rol oynarlar (26).

Proteinlerin saflaştırılması; etki mekanizmalarının, yapılarının, diğer moleküllerle olan ilişkilerinin açıklanması için gerekli olan ilk adımdır. Çeşitli proteinler, büyüklük, eriyebilirlik, yük ve özel bağlanma affiniteleri gibi bazı parametrelere bağlı olarak birbirinden ayrılabilir. Proteinlerin saflaştırılmasında amonyum sülfatla çöktürme, elektroforez, ultrasantrifüj gibi farklı teknikler kullanılmaktadır. Bu metodlarla albumin, fibrinojen, globulin gibi kan proteinleri birbirlerinden ayrılabilir. Elektroforetik tekniklerin gelişmesi (SDS-PAGE, nişasta, kâğıt, vb gibi) serum proteinlerinin ayrılmasında, proteinlerin yapı, genetik orjini ve hastalıklarla ilişkilerinin açıklanmasında önemli bir rol oynar (3, 27).

Normal bir serum protein elektroforezi sonucunda; albumin, α_1 , α_2 , β ve γ -globulinden oluşmuş 5 temel fraksiyon Şekil 2'de belirtildi (29). Sellüloz asetat elektroforezi ile elde edilen bu bantların sayısı hayvan türlerine göre değişir (5). Ancak uygulanan serum taze ise ve Ca^{+2} içeren tampon kullanılıyorsa 6.bant (β_2 , C3 kompleman bileşeni) görülmektedir (28). Protein fraksiyonlarının bileşimi Tablo 2'de, gösterildi (5).

Tablo 2. Protein fraksiyonlarının bileşimi (5).

1. a) Prealbumin	b) Albumin
2. α_1 - Globulinler	α_1 - antitripsin, α_1 - asit glikoprotein, α_1 - lipoprotein (Apolipoprotein A), α_1 -fetoprotein (AFP)
3. α_2 -Globulinler	α_2 -makroglobulin, Haptoglobulin, Serüloplazmin
4. β - Globulinler	β - lipoprotein (Apolipoprotein B), Transferrin, Kompleman proteinleri (C3, C4), β_2 - mikroglobulin, Hemopeksin
5. γ - Globulinler (İmmunoglobulinler)	Ig A, Ig M, Ig G, Ig D, Ig E



Şekil 2. Sellüloz asetat elektroforezi ile elde edilen protein bantları (29).

2.2.2.1. Prealbumin

Elektroforezde pH 8.62’de albumin fraksiyonunun önünde mobilite gösteren bir proteindir. Bütün proteinlerin % 0.2–0.5 kadarını oluşturur. Molekül ağırlığı 61000 daltonudur. Prealbumin, karaciğerde sentezlenir, molekül üzerinde retinol bağlayan proteini bağlayacak yerler ve tiroksin bağlayabilecek bir yer bulunur. Triptofandan zengin bir protein fraksiyonu olup, tiroksin hormonunun ve A vitamininin taşınmasında rol alır. Oral kontraseptif kullananlarda, gebelerde, inflamatuvar olaylarda, malign tümörlerde, malnütrisyonunda, karaciğer hastalıklarında serum prealbumin düzeyi azalır (5, 30).

2.2.2.2. Albumin

Serum albumin, karaciğerde sentezlenir ve total proteinlerin % 50–60 kadarını oluşturur. Molekül ağırlığı 69000 daltonudur. Elektroforezde pH 4–9.5 arasında iki

serbest alt gruba ayrılır. Renksiz, şekilsiz ve yumurta akı albuminine çok yakın bir maddedir. Serum albuminin önemli işlevleri vardır; bilirubin, uzun zincirli yağ asitleri, T_3 , T_4 , kortizol, aldosteron, Ca^{+2} , Cu^{+2} ve bazı ilaçları taşır. Endojen aminoasit deposu olarak görev görür. Plazma onkotik basıncının devamlılığını sağlar. Kanın viskozitesini etkiler. Serum albumin düzeyinin normal sınırlardan düşük olması *hipoalbuminemi* olarak tanımlanır. Serum albumin düzeyi 2,0 g/ dl'nin altına düştüğünde ödem gelişir (30).

2.2.2.3. α_1 -Globulin

α_1 -globulin fraksiyonunun önemli proteinleri; α_1 -antitripsin, α_1 -antikimotripsin, α_1 -asit glikoprotein (orosomukoid), α -fetoprotein (AFP)'dir.

α_1 -antitripsin; karaciğer parankim hücreleri, mononükleer seri hücreler ve alveoler makrofajlarda sentezlenir. Nadir olarak görülen kalıtsal α_1 -antitripsin eksikliği, klinik olarak amfizem ve neonatal kolestatik sarılık ile karakterizedir. Alfa fetoprotein (AFP), fötusun ana proteinidir, karaciğerde sentezlenir. Hepatosellüler karsinom ve diğer karaciğer hastalıklarında, gebelikte, testis ve ovaryum kanserlerinde, mide kanserinde serum alfa fetoprotein (AFP) düzeyi artar (30).

2.2.2.4. α_2 -Globulin

α_1 ve α_2 -globulinler arasında göç eden başlıca serum proteinleri, tiroksin bağlayan globulin ve seruloplazmindir. α_2 -globulin fraksiyonunun önemli proteinleri α_2 -makroglobulin ve haptoglobindir. Tiroksin bağlayan globulin, bir glikoproteindir; tiroid hormonları olan T_3 ve T_4 için temel taşıyıcıdır. Seruloplazmin, daha çok α_2 -globulin fraksiyonunda gözlenen, % 10 civarında karbonhidrat içeren bir bakırlı proteindir. Wilson hastalığında ve malnütrisyonunda serum seruloplazmin düzeyi azalır. α_2 -makroglobulin, α_2 -globulin fraksiyonunun büyük çoğunluğunu oluşturur. α_2 -makroglobulin, plazmanın en önemli proteaz inhibitörlerinden biridir. Haptoglobin, karaciğerde sentezlenen ve eritrosit dışındaki serbest hemoglobini bağlayan plazma glikoproteinidir (30).

2.2.2.5. β -Globulin

β -globulin fraksiyonunun önemli proteinleri, hemopeksin ve transferrin (siderofilin)'dir (32). Transferinin molekül ağırlığı 88000 dalton olup, demirin transportunu sağlar. β_2 mikroglobulin bütün çekirdekli hücrelerin yüzeyinde bulunur ve buradan özellikle lenfosit ve tümör hücrelerinden kana bolca geçer. Bu yüzden B-lenfositleri ile ilgili kanserlerin teşhisinde faydalıdır. Böbrek nakli yapılan kişilerde fonksiyon testi olarak kullanılabilir. Hemopeksinin molekül ağırlığı 57000 olup yüksek miktarda tirozin ve triptofan ihtiva eder. Spesifik görevi, her molekülün bir hem bağlamasıdır (5).

2.2.2.6. γ - Globulin

γ -globulin fraksiyonunun önemli proteinleri; immunoglobulinler (antikorlar), sistem proteini ve C-reaktif protein (CRP)'dir. Tablo 3 'de erişkin hayvanlardaki normal serum globulin konsantrasyonları belirtildi (28).

Tablo 3. Erişkin hayvanlarda normal serum globulin konsantrasyonları (g/dl) (28).

Globulin	Köpek	Kedi	At	Sığır	Koyun
Total Globulin	2.3–5.2	1.5–5.7	2.6–4.0	3.0–3.4	3.5–5.7
α -globulin	0.5–1.3	0.6–1.6		0.7–0.8	0.3–0.6
α_1 -globulin	0.2–0.5	0.2–1.1	0.06–0.7		
α_2 -globulin	0.3–1.1	0.4–0.9	0.31–1.31		
β -globulin	1.2–2.2	0.7–1.6		0.8–1.1	
β_1 -globulin	0.7–1.3	0.3–0.9	0.4–1.5		0.7–1.2
β_2 -globulin	0.6–1.4	0.6–1.0	0.2–0.8		0.4–1.4
γ -globulin	0.4–0.8	1.3–2.2	0.5–1.9	1.6–2.2	
γ_1 -globulin	0.5–1.3	0.3–2.5			0.7–2.2
γ_2 -globulin	0.4–0.9	1.4–1.9		0.2–1.1	

2.2.3. Elektroforez

Elektroforez terimi yunanca “elektron” ve Latince “phore” kelimelerinden oluşur (31). Elektroforez, elektriksel bir alanda yüklü partiküllerin göç etmesidir (8). Elektriksel alan içerisindeki göç; elektrik akımının şiddetine, net yüke, molekülün şekline, solüsyonun iyonik gücüne, viskozitesine ve sıcaklığına bağlıdır. Göç hızı, protein molekülü üzerindeki yükün büyüklüğü ile doğru orantılıdır. İyonik bileşiklerin iyonlaşması, elektroforezin temelini oluşturur. Zıt yükteki elektrotlara doğru farklı hızlarda hareket eden değişik yükteki iyonlar, elektriksel alanda birbirinden ayrılırlar. Elektroforez, ayrılması istenen iyonları ihtiva eden bir çözelti ile kağıt, nişasta, agar, selüloz asetat zarı gibi inert bir taşıyıcı materyalin teşkil ettiği bir sistemde yapılabilir (32–34).

Pozitif yük taşıyan moleküller, negatif yüklü kutup olan katoda ilerledikleri için katyon, negatif yüklüler ise pozitif yüklü kutup anoda ilerledikleri için anyon olarak adlandırılırlar. Bir molekülün elektriksel mobilitesini etkileyen faktörler vardır. Bunlar; molekülün net elektriksel yükü, molekülün şekil ve büyüklüğü, elektriksel alanın gücü, yürütme ortamının özellikleri (por genişliği, pH) ve yürütmenin yapıldığı sıcaklıktır.

Molekülün net elektriksel yükü, uygulanan elektriksel alan şiddeti, yürütmenin yapıldığı sıcaklığın artması gibi etkenler elektriksel mobilitiyi arttırırken, iyon büyüklüğü ve destek ortamının viskozitesi mobilitiyi azaltır. Şu şekilde kısaca ifade edecek olursak;

$$\mu = Q/k\pi\eta$$

μ = Elektriksel mobilité

Q = Molekülün net yükü

k = Sabit değer

r = Yürüyen partiküllerin iyonik çapı

η = Yürütme ortamının viskozitesi

Elektroforez; proteinlerin, izoenzimlerin ve lipoproteinlerin ayrılmasında kullanılır. Elektroforetik yöntemlerle serum, idrar, BOS (beyin omurilik sıvısı) veya diğer vücut sıvıları, eritrosit ve doku proteinleri analiz edilebilir (35).

Elektroforez fikri ilk kez 1809'da Reuss (36) tarafından öne sürüldü, 1937'de Tiselius (37), belirli bir pH derecesinde protein fraksiyonlarının taşıdıkları elektriksel yüklere göre değişik hızda hareket ettiklerini gösterdi ve plazma proteinlerinin bu yolla sınıflandırılabilceğini bildirdi. 1950'de kağıt elektroforezi kullanılarak proteinler ayrıldı (38), 1955'te Smithies (39) nişasta jel elektroforezi yöntemini geliştirdi. Poliakrilamid jelinin elektroforezde kullanılması, Raymond ve ark. (40) tarafından başarıldı. Destek ortam olarak agaroz jelin kullanılması Akselsen ve ark. (41), sellüloz asetatın kullanılması Kohn (42) tarafından geliştirildi (5).

Elektroforezde kullanılan tamponlar pH'ı sabit tutarlar, elektrik akımını iletirler ve moleküllerin tek yönde göç etmelerini sağlarlar. Elektroforezde kullanılan tamponlar: genelde format, asetat, fosfat, tris, EDTA ve pridindir. Tamponların iyonik kuvveti göçü etkileyeceği için genellikle 0,05–0,10 M derişimde ve her ayırma için uygun pH'da olmalıdır (5).

Elektroforez, moleküllerin tanınması ve saflaştırma analizi için uygulanır. Bir karışımındaki her molekülün tek bir yüke ve büyüklüğe sahip olması beklendiği için, elektriksel alanda mobilite de tek olacaktır. Bu beklenti, tüm elektroforetik metotlarda ayırma ve analiz için temel esastır. Buna dayanarak; özellikle aminoasitlerin, karbonhidratların, peptidlerin, proteinlerin, nükleotidlerin ve nükleik asitlerin elektroforetik analizi yapılır (43).

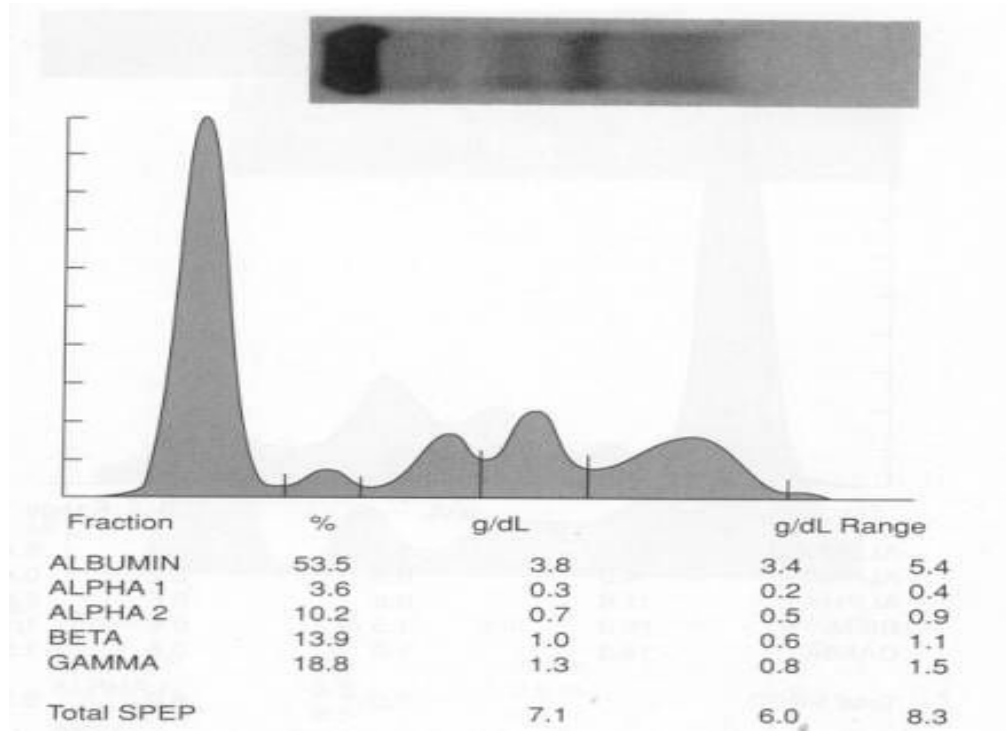
2.2.4. Elektroforez Çeşitleri

Kullanılan ayırma ortamının cinsine göre çeşitli elektroforez teknikleri kullanılmaktadır. Kağıt elektroforezi, selüloz asetat elektroforezi, agaroz jel elektroforezi, nişasta jel elektroforezi, poliakrilamid jel elektroforezi ve kapillar elektroforez bunlar arasında sayılmaktadır (44–47).

Kağıt elektroforezi hem rutin hem de araştırma maksatlı destek ortamı olarak kaliteli filtre kağıdı kullanılan elektroforez çeşididir. Metodun avantajı, ucuz ve yüksek gerilime dayanabilmesidir. Ancak, deney süresi uzun (16–18 saat) olduğundan rutinde pek kullanılmaz. Özellikle aminoasitlerin ayırımında kullanılır (5).

Serum proteinlerinin kağıt elektroforezinde anoda en hızlı göçen fraksiyon, prealbumin ve albumindir, en yavaş göçen fraksiyon γ -globulin fraksiyonudur. Prealbumin fraksiyonu rutin serum proteinleri elektroforezinde fark edilmez (48).

Selülozun hidroksil grupları asetik asit anhidrid ile reaksiyona sokularak elde edilen sellüloz asetat plaklarının kullanıldığı *sellüloz asetat elektroforezi* genellikle protein elektroforezi için kullanılır (Şekil 3). Pahalı olmaması, soğutma cihazı veya güç kaynağına ihtiyaç duyulmaması, ayırımın hızlı olması ve az miktardaki maddelerin de ayırımının yapılabilmesi, proteinleri minimum düzeyde absorbe etmesi gibi avantajlara sahiptir. Opak olması ve dansitometreden önce kısmen arıtılması için kimyasal işlemlere ihtiyaç göstermesi gibi dezavantajlara sahiptir. Ayrıca porları küçük olduğundan, büyük moleküllü proteinler elektroforeze tabi tutuldukları zaman bu tip elektroforezin kullanımı sınırlıdır (8, 30, 49, 50).



Şekil 3. Selüloz asetat elektroforezi ile elde edilen protein fraksiyonları (30).

Destek maddesi olarak bir karbonhidrat türevi olan agaroz veya agaropektinin kullanıldığı *agar jel elektroforez* çeşidi serum proteinlerinin, hemoglobin varyantlarının, laktat dehidrogenaz izoenzimlerinin, lipoprotein fraksiyonlarının analizinde başarılı bir

şekilde kullanılmaktadır (48). Bu maddelerin proteinlere affinitesi az olduğundan protein bantları birbirinden iyi ayrılır. Ayrıca çok iyi şeffaflaştıklarından dansitometrik değerlendirilmeleri daha güvenilirdir. Bu yüzden rutin uygulamalarda sıkça kullanılmaktadır. Bu teknikte uygulama süresi oldukça kısadır (30–90 dakika). Protein seperasyonunda sıkça kullanılan bu tekniğin üstünlüğü, ortamın proteinleri oldukça düşük oranda absorbe etmesi ve dansitometreye daha net bantlar sunmasıdır. Başka bir avantajı da çok sayıda proteinler üzerine çalışma imkanı vermesi ve çalışma tekniğinin kolay olmasıdır. Jelden proteinlerin yeniden elde edilmesi de oldukça iyidir (5, 49).

Destek ortamı olarak nişasta jelinin kullanıldığı *nişasta jel elektroforezini* (5), ilk defa Smithies (39) kullandı, elektroforetik ayrılmada numunenin elektrostatik yüklerinin önemi olduğunu vurgulayarak, jelin gözeneklere sahip olmasının seperasyonda kolaylık olduğunu belirtti. Bu özellik küçük moleküllerin büyük molekülleri jel ortamında kolaylıkla geçmesini sağlayarak, hareketin elektriksel yüke olduğu kadar molekül büyüklüğüne de bağlı olduğunu gösterir (39, 51, 52). Nişasta jeli elektroforezi çok iyi ayırma sağladığından hem rutin hem de araştırma maksatları için kullanılır (5).

Poliakrilamid jel elektroforezi (PAGE) ise poliakrilamidin bir bağlayıcı (genellikle bis akrilamid) ile polimerize edilmesi sonucu oluşturulur. Böylece rasgele büyüyen poliakrilamid ve bis akrilamid konsantrasyonları oluşacak jelin yoğunluğunu, viskozitesini, elastikiyetini ve mekanik dayanıklılığını belirler (46).

Poliakrilamid jel elektroforezi; SDS PAGE (denatüre edici page) ve ND-PAGE (non denatüre edici page) olarak ikiye ayrılır. ND-PAGE(non denatüre edici page); proteinlerin doğal (intakt) yapılarını bozucu ajanlar kullanmadan yapılan PAGE yöntemidir. SDS PAGE (denatüre edici page); SDS (Sodyum dodesil sülfat) anyonik bir deterjan olup iki amino asitte bir peptid zincirine bağlanarak protein moleküllerini oluşturan alt birimleri birbirinden ayırır. Jel konsantrasyonu arttırılarak, protein moleküllerinin molekül ağırlıklarına göre ayrışmaları sağlanır. SDS PAGE yöntemi proteinlerin saflığının kontrolü, molekül ağırlıklarının saptanması ve konsantrasyon çeşitliliğinin belirlenmesi amacıyla kullanılmaktadır. Proteinler için çok uygun olduğu gibi DNA ve RNA elektroforezleri için de kullanılabilir. Akrilamid miktarı ve akrilamid/bisakrilamid oranı jelin ayırıştırma kapasitesini belirler (53, 54).

Kapiller elektroforez, elektriksel alanda moleküllerin hareketine dayanan ayırım metodlarının en yenisidir. Bu teknik hızlı, duyarlı ve otomatik olarak kullanılabildiğinden çalışılan birçok protein ve polipeptidin tamamen ayrılabilmesi mümkün olmaktadır. Bu tip elektroforezin avantajları; yüksek voltajın kullanılabilmesi, ısı transferinin mümkün olması ile hızlı seperasyon, yüksek rezolüsyon, çok küçük numune hacmi gereksinimi ve işlem sırasında proteinin denatüre olmamasıdır. Dezavantajı ise proteinlerin tayini, miktarlarının saptanmasının güç olması ve proteinlerin kolona adsorbe olabilesidir (50, 55).

İmmunoelektroforez, antikor kullanmak suretiyle antijeni jel içinde tespit edip, tanımlamaya yarayan bir elektroforez tipidir. Bazen jel üzerinde birbirinden ayrılmış proteinler, antikorlar adı verilen immunoglobulinlerle etkileşerek antijenik durumları hakkında bilgi sahibi olunur. Antijen-antikor reaksiyonu ile elektroforez yöntemini birlikte içeren bir tekniktir. Serum proteinleri önce elektroforeze uğratılır, sonra bir jel ortamında antiserum ile karşılıklı diffüzyonu sağlanır. Oluşan antijen-antikor reaksiyonları sonucunda oluşan presipitasyonlar kavisler halinde belirir. Serum ve plazmada sayısı 150'den fazla olan proteinlerin 70 kadarını bu yöntemle ayırmak mümkün oldu (5, 48).

2.2.5. Elektroforez Kullanım Alanları

Elektroforez; proteinleri ayırmada kullanılan bir teknik olup serum, plazma, idrar, gözyaşı, dışkı, eklem sıvısı gibi organik ürünlere uygulanabilir. Serum veya plazma proteinlerinin sınıflandırılması, protein miktarlarının tespiti, proteinlerin yerinin tespiti, anormal hemoglobinlerin tespiti, bazı hastalıkların teşhisi, taylarda kan grubu tayini, hastalığın safhalarının (akut, subakut, kronik) belirlenmesinde, karaciğer-böbrek hastalıklarında, monoklonal globulin bozukluğunun (myelom) belirlenmesi v.b gibi kullanım alanları vardır (30, 56). Çeşitli hastalık durumunda selüloz asetat elektroforezi ile elde edilen protein fraksiyonları Şekil 4'de gösterildi (30).

2.2.6. Çeşitli Hastalıklarda Serum Protein Fraksiyonları

Malnütrisyon veya ağır protein kaybı olgularında gelişen hipoproteinemilerde tüm bantlarda azalma izlenmesine rağmen en belirgin azalma albuminde görülür. Ağır

açlık durumlarında veya ilerleyen kronik hastalıklarda albuminde görülen azalmaya α_1 ve α_2 bantlarında yer alan α_1 -antitripsin, α_2 -makroglobulin, haptoglobulin, transferin ve C3 katılmaktadır. Protein kaybedilen enteropatilerde, tüm bantlarda sentez azalmasına veya kaybın artmasına bağlı soluklaşma, α_2 bandında ise artış izlenmektedir (56).

Normalde bulunmayan bantların görünür hale gelmesi ise değişik klinik durumlarda gözlenmektedir. Albumin ile α_1 bandı arasında belirecek soluk bir bant, bazı kötü huylu tümörlerde serumda artan α -fetoproteine bağlıdır. Monositer lösemilerde lizozim düzeyinin artışı γ bölgesinden ileride bir bant oluşturmaktadır. Protein kaybedilen nefropatilerde albumin, α_1 , β ve γ -globulinlerde azalma görülür (56).

Aktif hemoliz sonucu haptoglobulin eksikliği olan kişilerde α_2 veya β bölgelerine göçen bağımsız bir hemoglobin bandı izlenmektedir. Demir eksikliği olgularında transferin artışına bağlı belirgin β bandı izlenmektedir. Bu yüzden myeloma bandı ile karışabilmektedir (56).

Karaciğer sirozu olgularında albumin sentezinin azalması ve kaybının artması sonucu serum konsantrasyonu azalmaktadır. Albumindeki azalma γ fraksiyonundaki immunglobulinlerin artışı ile dengelenmektedir. Tüm immunglobulinleri kapsayan γ globulin fraksiyonundaki artma ve yavaş β bölgesine uzanan IgA artışı, β - γ köprüleşmesi olarak adlandırılmaktadır (56).

Hipogamaglobulinemi γ bandının tamamına yakın veya tamamının yokluğudur. Lenforetiküler bozukluklarda ve kanser tedavisi için kemoterapi uygulanan vakalarda ve yeni doğanlarda rastlanır (56).

Akut ve kronik karaciğer hastalıkları, kronik enfeksiyonlar, akut diffüz glomerülonefrit, sarkoidoz, karsinom ve otoimmün hastalıklarda serum γ -globulin fraksiyonu artar. Nefrotik sendrom, ağır malabsorpsiyon ve malnütrisyon, primer immun yetmezlik ve sekonder immun yetmezlik durumlarında serum γ -globulin fraksiyonu azalır (30).

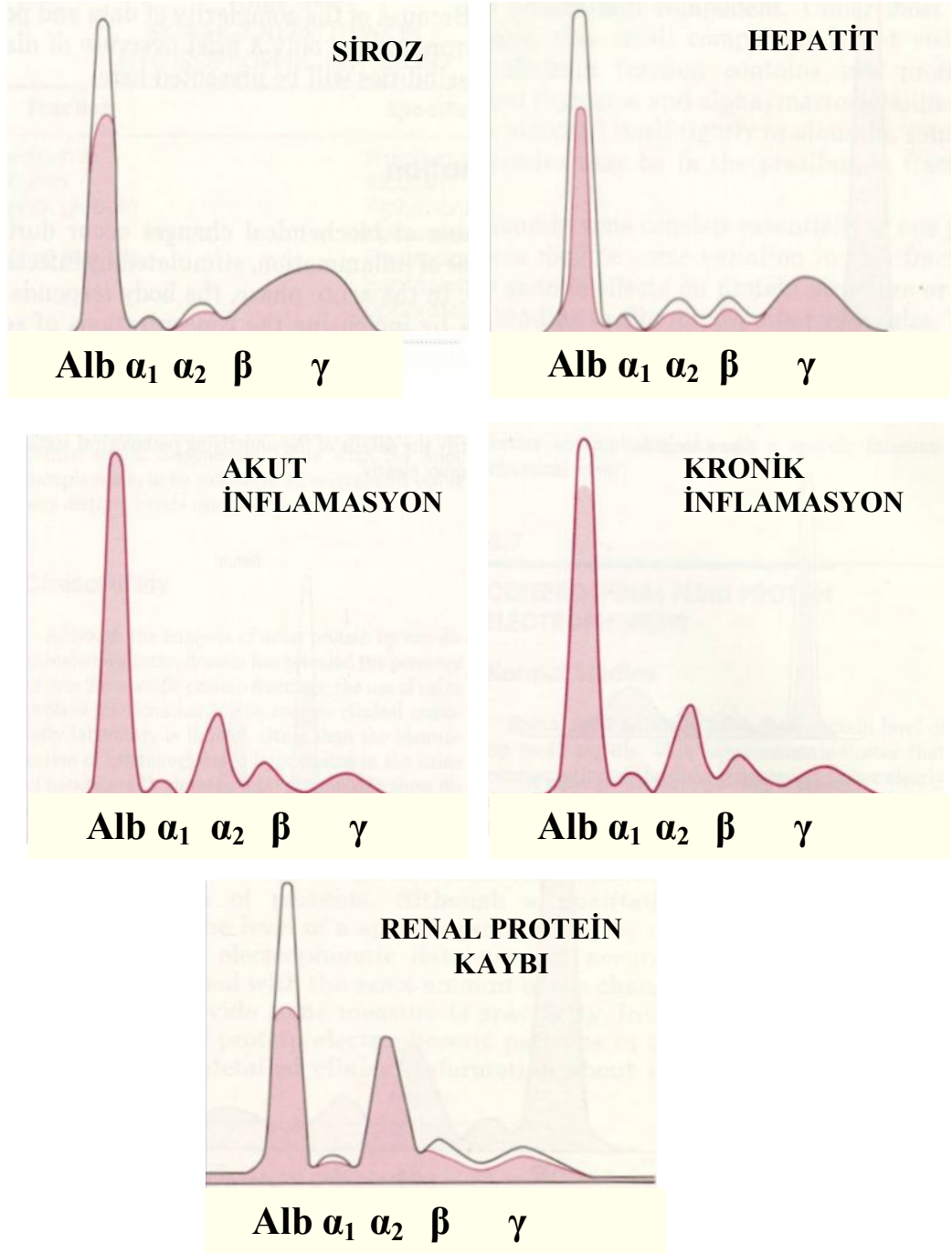
Karaciğer hastalıklarında özellikle β -globulin fraksiyonunda belirgin bir artış gözlenir. Sirozda serum albumin düşer, serum γ -globulin artışı hafiftir, α -globulin ve β -

globulin konsantrasyonları serum lipoproteinindeki artışa bağı olarak yükselir. Karaciğer paransimal sentezin yetersizliğinden serum albumin konsantrasyonundaki düşme erken bir değişiklik değildir ve diffuz fibröz ya da subakut hepatit gibi kronik şartlarda daha çok görülür. Portal fibrozda karakteristik değişiklik; genellikle serum albumin düzeyinde düşüş ve γ -globulindeki artış şeklindedir. Serum albuminde değişiklik akut hepatitte de açıkça düşme şeklindedir, fakat γ -globulinde artış hafif kalır. Safra yolu tıkanıklıklarında yüksek konsantrasyonundaki düşme, erken bir değişiklik değildir ve diffuz fibroz ya da subakut hepatit gibi kronik şartlarda daha çok görülür. Portal fibrozda karakteristik değişiklik genellikle serum albumin düzeyinde düşüş ve γ -globulindeki artış şeklindedir. Serum albuminde değişiklik akut hepatitte de açıkça düşme şeklindedir, fakat γ -globulinde artış hafif kalır (57).

Karaciğeri hastalıklı olanların bazılarında hepatositin albumin sentezi bozulur. Kronik hepatosellüler bozuklukta plazma albumini düşer ve izleyen safhalarda hastalığın takibinde iyi bir gösterge olarak yararlanılır. Buna karşın akut karaciğer hastalıklarında plazma albumininde düşüş yoktur ya da çok azdır. Bunlarda albuminin biyolojik yarı ömrü yaklaşık 20 gündür ve fraksiyonel klirens hızı bu yüzden düşüktür. Hepatik sentezi bozan diğerk faktörler, plazma albumin düşüşüne ve ascitese yol açabilirler, besinsel yıkımda artışa ve yokluğa neden olabilirler (57).

Serum globulin düzeyleri, karaciğer hastalıklarının tayininde önemli olan diğerk testlerle birlikte bilgi verebilir. α_1 -fetoprotein, normalde embriyonal karaciğer hücresi tarafından sentezlenir ve gebelik sırasında fötal seruma salgılanır. Anaplastik hepatoma hücreleri bu embriyonik proteinin salınımına izin verir. Bir diğerk tümör proteini olan karsinoembriyonik antijen, hepatomada ve kolonun metastazik kanserlerinde yükselir. Tanıda diğerk yeni yaklaşımlar hepatosellüler nekrozun bir ölçüsü olarak serum ve idrarda karaciğer taşıyıcı protein bağlayıcısının RIA ölçümünü kullanırlar (57).

Plazma haptoglobulin hemoliz arttığında (hemolitik anemi) düşer ve serbest haptoglobin tespit edilemez. Plazma haptoglobin düşüşü karaciğer hastalığında ve nadiren konjenital bir anormallikte de gözlenir. Akut enfeksiyonlarda ve travmayı takiben plazmada haptoglobin artar. Nefrotik sendromda da artış gösterir. Bazı serum protein fonksiyonları ve çeşitli hastalıklardaki değişimleri Tablo 4'de belirtildi (57).



Şekil 4. Çeşitli hastalık durumunda selüloz asetat elektroforezi ile elde edilen protein fraksiyonları (30).

Tablo 4. Bazı serum protein fonksiyonları ve çeşitli hastalıklardaki değişimleri (57).

Protein	Molekül ağırlığı	Fonksiyon	Hastalıkta Değişim
Prealbümin	61.000	T ₄ taşıyıcısı	Rastlanmamıştır
Albümin	69.000	Osmotik basınç düzenlenmesi, Taşıma	Dehidratasyonda artar. Kötü beslenme, karaciğerhastalıkları,böbrek hastalıkları, gastroenteropatiler,kan ve plazma kaybı
α-globülinler (α_1-α_2)			
Tiroksin bağlayıcı globülin	50.000	T ₄ taşınması	
α_1 - fetoprotein	65.000		Artış: Hepatom?
α_1 -antitripsin	45.000	Tripsin inhibitörü	Düşüş: Kronik solunum hastalıkları Artış: Akut yangısal hastalıklar
α_1 -asit glikoprotein			Artış: Akut yangısal hastalıklar
α_1 . lipoprotein (HDL, α - lipoprotein)		Lipid taşınması	
α_2 . lipoprotein (VLDL pre- β lipoprotein)		Lipid taşınması	
α_2 .lipoprotein(LDL, β - lipoprotein)		Lipid taşınması	Nefrotik sendrom
α_2 .makroglobülin	820.000	İnsülin bağlayıcı tripsin inhibitörü	Artış: Nefrotik sendrom, aktif karaciğer hastalıkları, akut yangısal hastalıklar
α_2 -Globülin (prealbümin)		T ₄ taşıyıcısı	
Seruloplazmin (α_2)	160.000	Bakır taşıyıcı ferriksidaz	Artış: Akut yangısal hastalıklar
Haoptoglobülin(α_2)	100.000	Hemoglobin bağlayıcı	Düşüş: hemolitik anemi, karaciğer hastalıkları Artış: Akut yangısal hastalıklar
β- globülinler (β_1, β_2)			
Transferrin	90.000	Demir taşıma	Düşüş: Kronik karaciğer hastalıklar, demir depolama hastalığı Artış: Akut karaciğer hastalıkları, gebelik, demir yetersizliği, anemi, nefrotik sendrom
Hemopeksin	80.000	Hem bağlama	Düşüş:Hemolitik anemi, aktif karaciğer hastalıkları
C ₃ komplemanı	75.000	Komplement C ₃ faktör	Düşüş: otoimmün hastalık Artış: akut yangısal hastalık, atopik dermatitis
C ₄ komplemanı		Komplement C ₄ faktör	Düşüş: otoimmün hastalık
Plazminojen		Plazmin'in proenzimi Fibrinolizis	Artış: Dissemine intravasküler koagülasyon (DIC)
Fibrinojen		Fibrinin ön şekli, pıhtılaşma	Düşüş: DIC Artış: Akut yangısal hastalık
γ-globülinler			
Ig G	150.000	Enfeksiyöz ajanlar, toksinlere karşı antikorlar	Düşüş: Agammaglobülinemi Artış: Kronik hastalıklar, destek doku hastalıkları,karaciğerhastalığı,miyeloma , diğer monoklonal gamopatiler
Ig A	150.000	Antikorlar,solunum,ürogenital ve gastrointestinal organlardaki sıvılarda salgılanmış antikorlar	Ig G'deki gibi
Ig E	200.000	Antikorlar, alerjik reaksiyonlar	Düşüş: Agammaglobülinemi Artış: Alerji, anafaksi
Ig M	900.000	Antikorlar, hücre reaksiyonu başlatıcıları	Düşüş: Agammaglobülinemi Artış: birincil makro globülinemi (waldenstrom'un), kronik hastalık
Ig D	160.000	Bilinmiyor, hayvanlarda rapor edilmemiş	
Hafif zincirler(Bence-Jones)	30.000	İmmunglobülin yapının bir kısmı	Artış: Miyeloma, monoklonal gammopatiler

3. MATERYAL VE METOT

3.1. Materyal

3.1.1. Hasta materyali

Çalışmada canlı materyal olarak, Van ve çevresinde parazitolojik ve klinik olarak babesiosis tanısı konulan, ortalama 1.5–2 yaşlarında, Akkaraman ırkı dişi koyunlar kullanıldı.

Kontrol grubu olarak yaş ve cinsiyet bakımından uygun olan, hematolojik ve biyokimyasal analizleri normal, 20 sağlıklı Akkaraman ırkı koyun seçildi. Yaş ve cinsiyet bakımından uygun olan, babesiosis teşhisi konulan 36 koyun hasta grubu olarak ayrıldı. Hasta koyunlar tedavi edilerek tedavi sonrası grubu oluşturuldu.

Paraziter ve Klinik Muayene

Beden ısısı 40–42°C olan, anemi, ikterus, görünen mukozalarda peteşiel kanama ve hemoglobüri semptomları gösteren babesiosis şüpheli koyunların V.auricularis'inden kan alınarak sürme kan frotisi hazırlandı. Periferik kandan hazırlanan sürme kan frotileri 5 dakika süreyle metil alkolde tespit edildi. Tespit edilen frotiler % 5'lik Giemsa boya solüsyonu ile laboratuvar ortamında 30 dakika süreyle boyandı ve yıkanıp kurutulduktan sonra immersiyon objektifte muayene edildi. Mikroskopik bakıda eritrositler içinde kenara yakın kısımlarda 1.2–1.5 µm büyüklükte tek veya çift armut formunda ya da daha değişik *Piroplasma* formları görüldü.

Babesiosisli koyunlara diminazen aceturat (Fa. Try. Banil R. T. U.) % 7'lik solusyon halinde 3.5 mg/kg canlı ağırlık dozunda i.m., *Anaplasma* etkenlerinin eradikasyonu için oksitetrasiklin (Panox LA) 10-20mg/kg i.m. ve kan yapıcı ilaç olarak vitamin B₁₂ (Dodex) i.m. uygulanarak tedavi edildi. 5 gün sonra kan alınarak tedavi grubu oluşturuldu.

Kan örneklerinin alınması ve hazırlanması

Babesiosisli ve tedavi edilen koyunların V. jugularis'inden usulüne uygun olarak normal tüplere alınan kan örnekleri oda ısısında 5 dakika bekletildikten sonra çizilerek, kan pıhtısı tüpün çeperinden ayrıldı ve 3000 rpm/dk'da 5 dakika süreyle santrifüj edilerek serumlar eppendorf tüplerine alınarak analizler yapılncaya kadar derin dondurucuda (-20 °C) saklandı.

3.1.2. Kullanılan alet ve kimyasal maddeler

Derin dondurucu (Arçelik),
Heraeus Sepatech Minifuge RF Soğutmalı Santrifüj,
Ceti Belgium Mikroskop
BoecoS-22 UV- Vis Spektrofotometre ,
Helena Lab- 4063 Elektroforez Tankı
Helena Lab -1511 Güç kaynağı
Helena Lab - Titan III Sellüloz asetat kartları
Helena Lab – 1261 Dansitometre
Biohit Otomatik Pipet,
Epson LX 850 Yazıcı
Ependorf tüp
Antikoagulantsız Cam Tüp Vakumlu Kapaklı
Giemsa Solusyonu
NaOH (Merck)
Sodyum potasyum tartarat (Merck)
Bakır sülfat (Horasan Kimya)
Potasyum iyodür(Teknik Kimya)
Sodyum klorür (Merck)

3.2. Metot

3.2.1. Sellüloz Asetat Elektroforezi ile Serum Proteinlerinin Analizi

Çözeltiler

1. Tampon Solusyonunun Hazırlanması:

pH'sı 8.6–9.0 olan Electra HR® Buffer (Cat. No. 5805) 750 ml distile suda eritildi.

2. Clear Aid Solusyonu:

Clear aid (Cat. No. 5005) polyethylene glycol içerir. 30 birim glacial asetik asit, 70 birim metanol ve 4 birim Clear Aid.'in karışımı sonucu elde edildi.

3. Ponceau S Stain:

Bir paket Ponceau S Stain 1 lt distile suda eritildi. % 3.5 triklorasetik asit ve % 3.5 sülfosalisilik asitin sulu solusyonunda 250 ml % 0.50 Ponceau S içerir.

Elektroforetik analizin yapılışı

- Gerekli ayıraçlar hazırladı.
- Sellüloz asetat kartı, pH'sı 8.6–9.0 olan barbital buffer ve tris içeren tampon solusyonunda (Electra HR Buffer Cat No. 5805) karta negatif yük yüklemek için 20 dakika bekletildi.
- Bekleme sonucunda alınan asetat kartı kurutma kağıdı arasında hafifçe kurutuldu.
- Yürütme tankının + ve – kutuplarının olduğu bölmelere 100'er ml (2/5'i kadar) aynı tampon solusyonundan konuldu. Filtre kâğıdı yardımıyla yürütme tankı ile tampon solusyonu arasında temas sağlandı.

- Senter applikatör yardımıyla sellüloz asetat kartının sellüloz kısmına 8–10 µl serum örneği uygulandı.
- Sellüloz asetat kartının sellüloz kısmı aşağı gelecek şekilde yürütme tankına konulan filtre kâğıtlarının üzerine yerleştirildi ve üzerine kaymaması için lam bırakıldı.
- Yürütme tankının kapağı kapatıldı, 180V’ da 15 dakika bekletildi.
- Yürütme sonucu oluşacak bantlar uygulama noktasına en yakından başlayarak γ -globulin, β -globulin, α_2 - globulin, α_1 -globulin ve albumin bantları oluştu. Molekül ağırlığı küçük olan en uzağa gitti.

Boyama işlemi

Yürütme işlemi tamamlandıktan sonra sellüloz asetat kartı lam sepetine alınıp, sırasıyla şu işlemlere tabi tutuldu.

- Ponceau S solüsyonunda 6 dakika bekletildi.
- % 5’lik glacial asetik asitte ikişer dakika süreyle üç defa bekletildi.
- % 100’lük metanolde ikişer dakika süre ile iki defa bekletildi.
- 5–10 dakika (7 dakika tercih edilir) süre ile Clear Aid solüsyonunda bekletildi.
- Sellüloz asetat kartı 15 dakika süre ile 50–60 °C’de etüvde bekletilerek, kart şeffaf hale geldi.
- Kart dansitometreye yerleştirildi ve total protein %100 kabul edilip piklerin başlangıç ve bitiş noktaları işaretlenerek her proteinin kendine ait yüzdesi çıkarılarak yüzde alan hesaplaması yapıldı.

3.2.2. Serum Protein Analizi (Biüret Metodu) (45)

Proteinleri teşkil eden aminoasitlerin tabiatı ne olursa olsun bütün proteinler peptid bağı ihtiva ederler. Bu peptid bağları kuvvetli alkali solüsyonunda Cu^{+2} iyonları ile bağlanarak pembe renkli bir kompleks oluştururdular. Rengin şiddeti, peptid bağlarının sayısı ve bununla ilgili olarak protein miktarı ile orantılıdır. Biüret ayırıcı ile proteinlerdeki peptid bağları 546 nm de ölçüldü. Mavi menekşe renkli bir kompleks oluştu. Protein miktarı ile oluşan rengin şiddeti arasındaki ilişkiden formül yardımıyla protein miktarı tayin edildi.

Ayır  lar

1- Biüret Reaktifi:

400 ml taze hazırlanan, karbonatsız 0.2N NaOH içinde 9.0 g sodyum potasyum tartarat ve 3.0g CuSO₄ (toz haline getirilmiş) eritildi.  zerine 5.0g KI eklenip eritildi ve 0.2N NaOH ile litreye tamamlandı.

2- % 0.9 NaCl solüsyonu (Fizyolojik Tuzlu Su):

9 g NaCl bir miktar distile suda eritilerek litreye tamamlandı.

3- 0.2N NaOH Hazırlanması:

8 g NaOH bir litreye tamamlanarak 0.2 N NaOH hazırlandı.

Yapılışı

- İki deney tüpü alındı. Test, reaktif k r  olarak işaretlendi.
- Test tüpüne 10  l serum konuldu.
- Reaktif k r  ve test tüpüne 500  l % 0.9 NaCl solüsyonu ilave edildi.
- Reaktif k r  ve test tüpüne 500  l Biüret ayıracı ilave edildikten sonra tüpler kapatılıp, 30 saniye süre ile çalkalandı, oda sıcaklığında 5 dakika beklendi, distile suya karşı 546 nm’de spektrofotometrede değerler saptandı.

Hesaplanması: (Test- Reaktif K r ) x 33.2 = % g protein

Tablo 5’de incelenen hasta grup, tedavi sonrası grubu ve kontrol grubuna ait elde edilen ortalama değerler % olarak sunulurken, Tablo 6’da bu değerler özellikle % g’a çevrildi. Bu yolla literatür değerlerinin yorumlanmasında gerek % ve gerekse % g birimlerinin kullanılmasına olanak sağlandı

Total protein ortalamaları temel alınarak elektroforez fraksiyon yüzdeleri % g'a oran-orantı yardımıyla aşağıdaki gibi çevrildi.

$$\begin{array}{ccc} \% 100 & & \text{Total Protein \% g} \\ & \diagdown & \diagup \\ & & X \\ \% \text{ Albümin Değeri} & & \end{array}$$

$$X = \frac{\% \text{ Albümin Değeri} \times \text{total Protein \% g}}{\% 100} = \% \text{ g Albümin}$$

3.2.3. İstatistik Analiz

Kontrol, hasta ve tedavi sonrası gruplar arası farklılığın önemi için SPSS 11,5 paket programı ile varyans analizi yapıldı. Çoklu karşılaştırma için de Duncan testi yapıldı (58).

4. BULGULAR

Total protein ve serum protein elektroforezi sonucu tespit edilen protein fraksiyonlarının ortalama sonuçları % olarak Tablo 5’de sunuldu.

Tablo 5. Kontrol grubu ile babesiosisli hasta ve tedavi gruplarındaki protein fraksiyon konsantrasyonları.

Parametre	Kontrol Grubu ($\bar{x} \pm Sx$) n=20	Hasta Grubu ($\bar{x} \pm Sx$) n=36	Tedavi Grubu ($\bar{x} \pm Sx$) n=36	p
TP (gr/dl)	5.32 $\pm$ 0.42 ^a	3.45 $\pm$ 0.22 ^b	4.60 $\pm$ 0.21 ^a	**
Albumin (%)	35.29 $\pm$ 0.84 ^b	37.46 $\pm$ 0.61 ^b	40.60 $\pm$ 0.70 ^a	***
α_1 -globulin (%)	2.68 $\pm$ 0.95 ^b	3.14 $\pm$ 0.11 ^a	2.76 $\pm$ 0.06 ^b	**
α_2 -globulin (%)	14.73 $\pm$ 0.39 ^a	13.26 $\pm$ 0.32 ^b	15.28 $\pm$ 0.22 ^a	***
β -globulin (%)	8.85 $\pm$ 0.26 ^a	9.52 $\pm$ 0.55 ^a	8.43 $\pm$ 0.20 ^a	*
γ -globulin (%)	36.99 $\pm$ 1.44 ^a	36.63 $\pm$ 0.56 ^a	32.94 $\pm$ 0.48 ^b	***
A/G	0.55 $\pm$ 0.02 ^b	0.61 $\pm$ 0.02 ^b	0.71 $\pm$ 0.22 ^a	***

- *p>0.05, **p<0.01, ***p<0.001.
- a, b: Aynı satırda farklı harfle gösterilen ortalamalar arası fark önemlidir (p< 0.05).

İncelenen serum total protein düzeyleri minimum ve maksimum olarak, % 3.45–5.32 g/dl arasında saptanırken, albumin % 35.29–40.60, α_1 -globulin % 2.68–3.14, α_2 -

globulin % 13.26–15.28, β -globulin % 8.43–9.52, γ -globulin % 32.94–36.99 ve A/G oranları % 0.55–0.71 arasında yer aldı.

Total proteinin (TP) hasta gruptaki düzeyi kontrol grubuna göre önemli oranda ($p<0.01$) düşük olduğu tedaviyle birlikte yükseldiği, hasta grup ve tedavi sonrası grubu arasındaki farkın önemli olduğu ($p<0.01$) saptanarak Şekil 11’de gösterildi.

Albuminin hasta gruptaki düzeyi kontrol grubuna göre yüksek bulunarak, tedaviyle birlikte bu düzeyin kontrol ve hasta gruba göre önemli oranda ($p<0.001$) arttığı Şekil 12’de belirtildi.

α_1 -globulinin hasta gruptaki düzeyi kontrol grubuna göre önemli oranda ($p<0.01$) fazla olduğu belirlenerek, tedaviyle birlikte normal düzeye düştüğü Şekil 13’de sunuldu.

α_2 -globulin miktarı hasta grupta, kontrol grubuna göre önemli oranda ($p<0.001$) azaldığı saptanarak, tedaviyle birlikte bu düzeyin önemli oranda ($p<0.001$) yükseldiği ve kontrol grubuna yaklaştığı Şekil 14’de gösterildi.

β -globulin açısından gruplar arasında istatistiksel önem ($p>0.05$) saptanmadı. Hasta gruptaki düzeyi kontrol grubuna göre fazla bulunduğu ve tedavi sonucunda azalma görüldüğü Şekil 15’de belirtildi.

γ -globulinin hasta grupta ve tedavi sonrası grupta, kontrol grubuna göre önemli oranda ($p<0.001$) azaldığı saptanarak, tedaviyle birlikte bu düzeyin hasta grubuna göre önemli oranda azaldığı Şekil 16’da sunuldu.

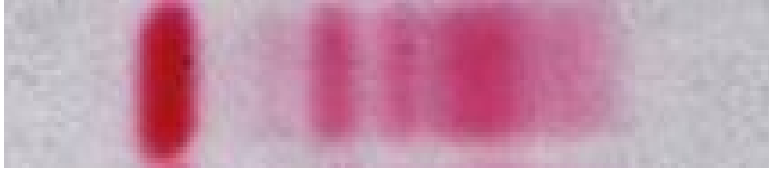
A/G oranının hasta gruptaki düzeyi tedavi grubuna göre önemli oranda ($p<0.001$) yükseldiği Şekil 17’de belirtildi.

Tablo 6. Protein fraksiyonlarının % g'a çevrilmeleri sonucunda elde edilen değerler.

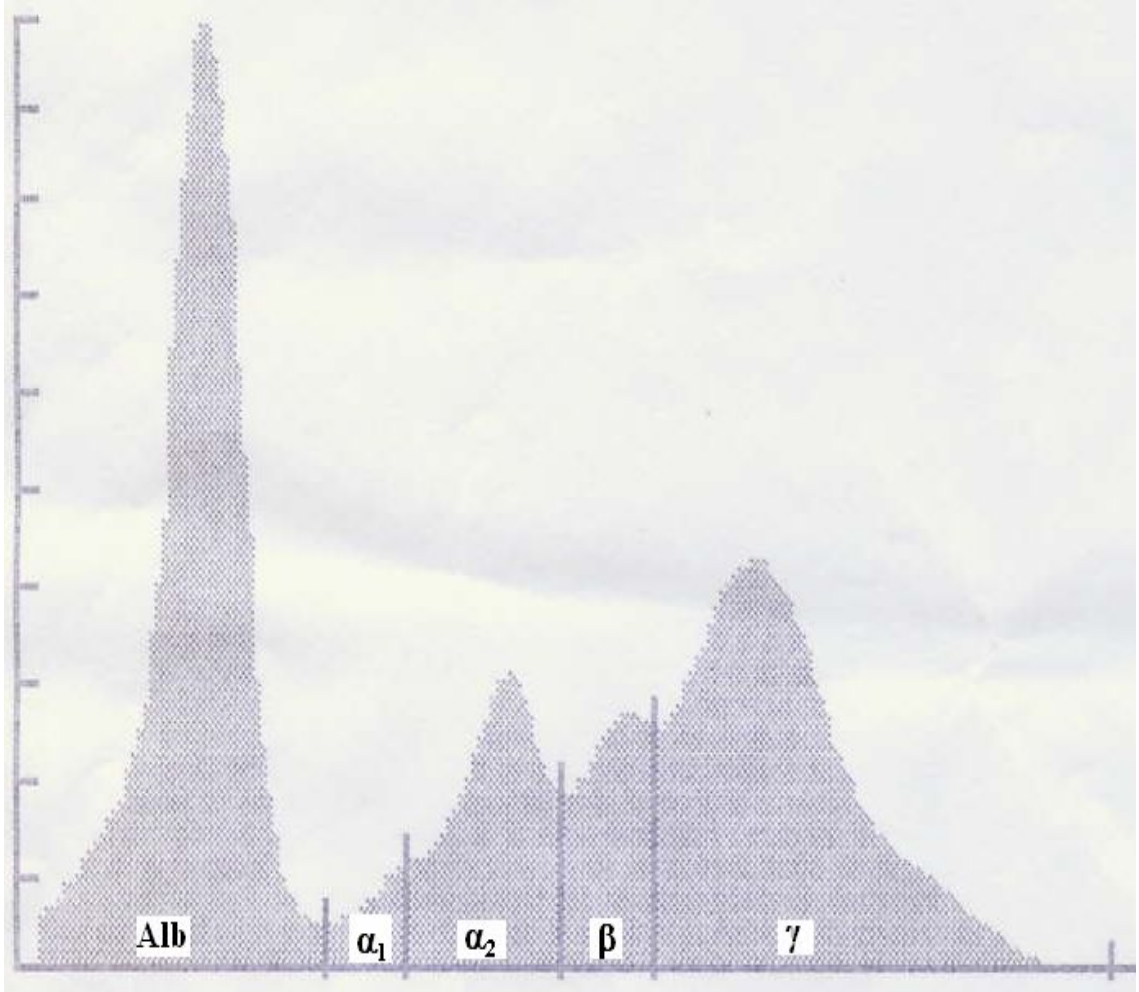
Parametre	n	Kontrol Grubu	n	Hasta Grubu	n	Tedavi Grubu
TP (% g)	20	5.32	36	3.45	36	4.60
Albumin (% g)	20	1.88	36	1.29	36	1.88
α_1 -globulin (% g)	20	0.14	36	0.11	36	0.13
α_2 -globulin (% g)	20	0.78	36	0.46	36	0.70
β -globulin (% g)	20	0.47	36	0.33	36	0.39
γ -globulin (% g)	20	1.97	36	1.26	36	1.52
A/G (% g)	20	0.03	36	0.02	36	0.03

İncelenen serum total protein düzeyleri % 3.45–5.32 g/dl arasında saptanırken, albumin % 1.29–1.88 g, α_1 -globulin %0.11–0.14 g, α_2 -globulin %0.46–0.78 g, β -globulin %0.33–0.47 g, γ -globulin %1.26–1.97 g ve A/G oranları %0.02–0.03 arasında yer aldı.

Kontrol, hasta ve tedavi sonrası gruplarda selüloz asetat ile elde edilen serum protein fraksiyonlarının elektroforetik ve dansitometrik görünüşleri Şekil 5, 6, 7, 8, 9 ve 10'da sunuldu.



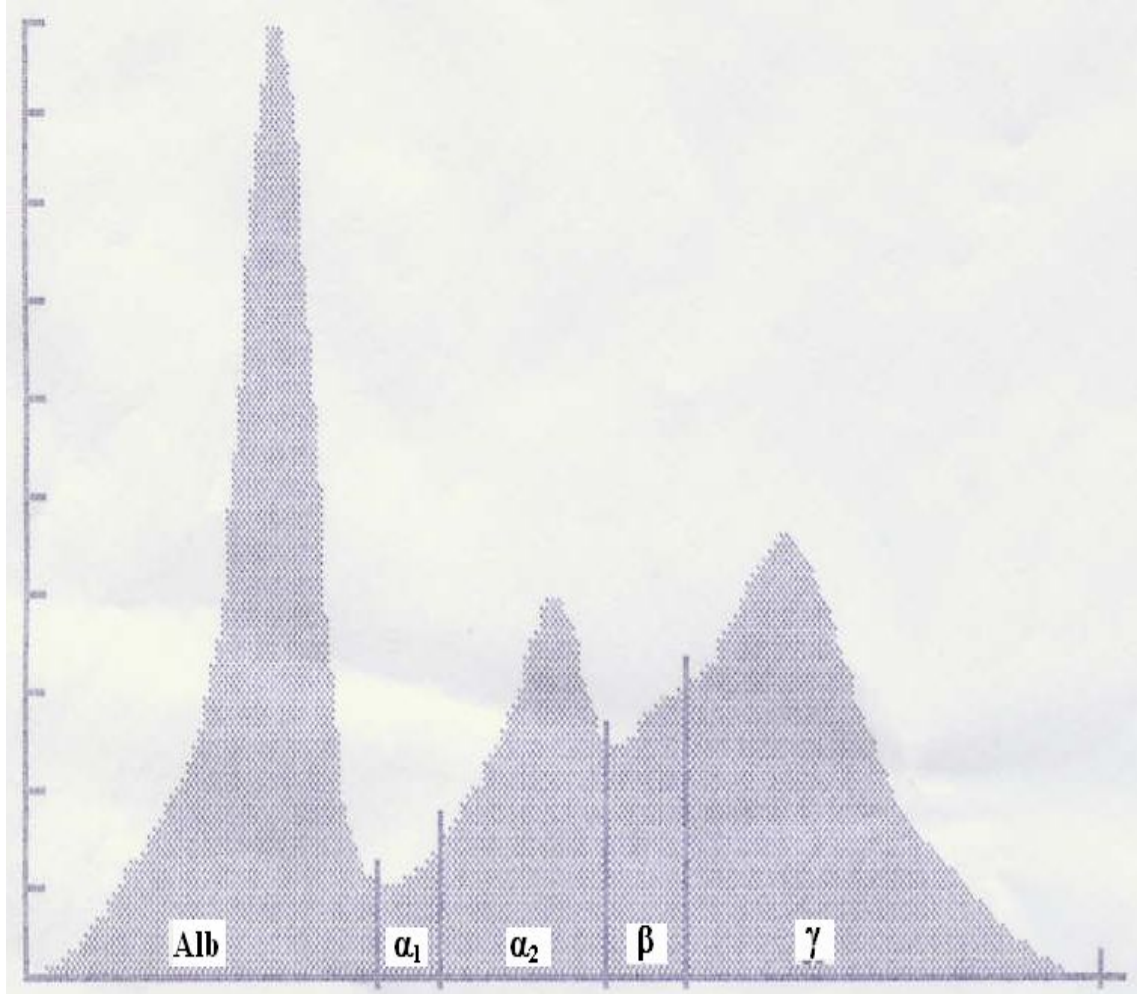
Şekil 5. Kontrol grubunda sellüloz asetat ile elde edilen elektroforezdeki protein fraksiyonları.



Şekil 6. Kontrol grubunda sellüloz asetat ile elde edilen elektroforezdeki protein fraksiyonlarının dansitometrik görünüşleri.



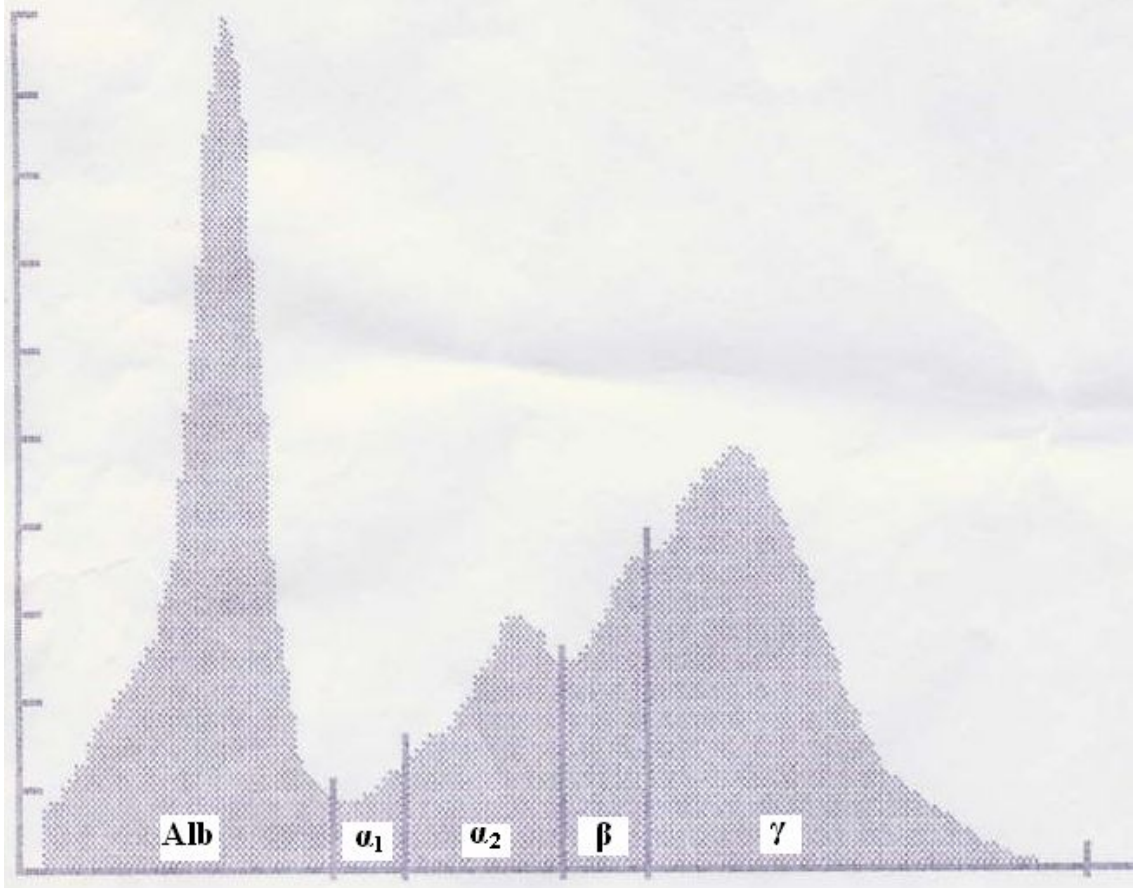
Şekil 7. Hasta grupta sellüloz asetat ile elde edilen elektroforezdeki protein fraksiyonları.



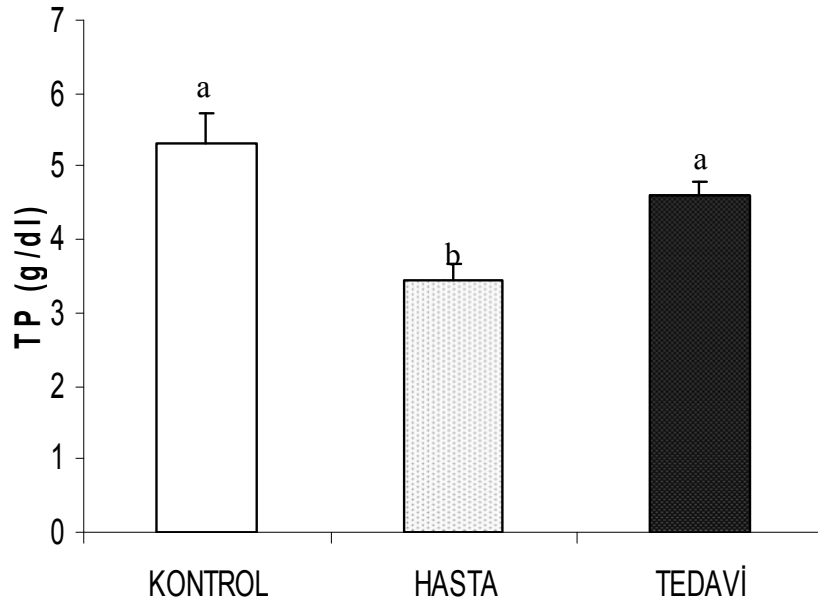
Şekil 8. Hasta grupta sellüloz asetat ile elde edilen elektroforezdeki protein fraksiyonlarının dansitometrik görünüşleri.



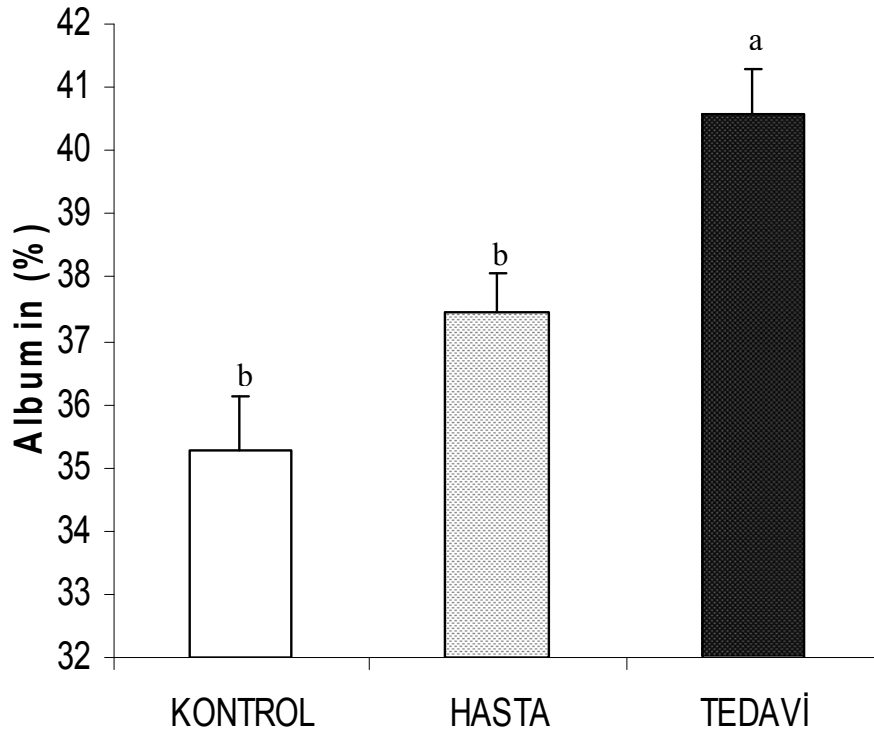
Şekil 9. Tedavi grubunda sellüloz asetat ile elde edilen elektroforezdeki protein fraksiyonları.



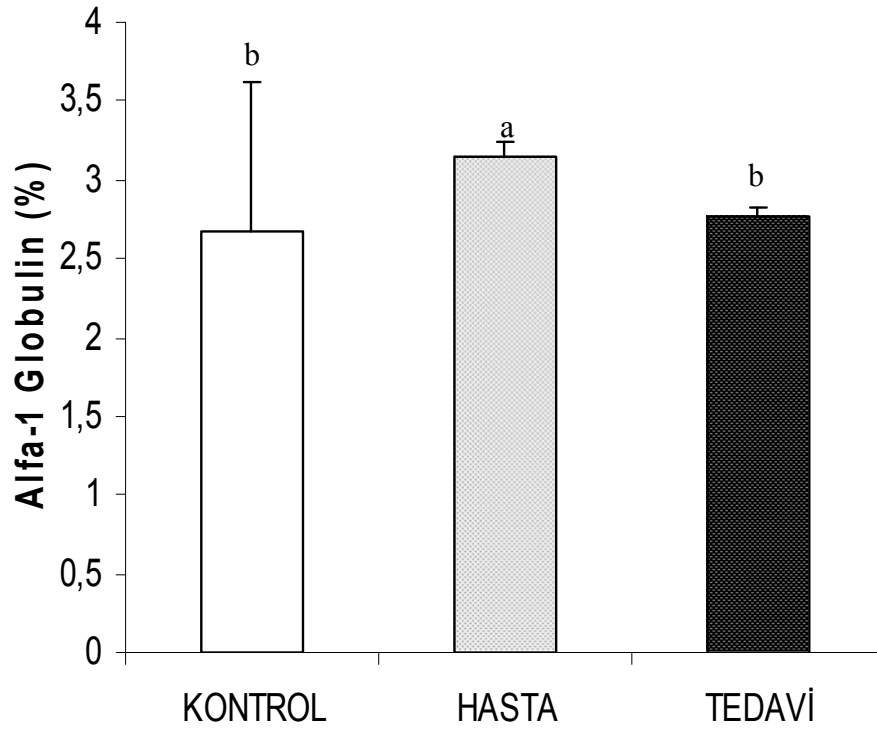
Şekil 10. Tedavi grubunda sellüloz asetat ile elde edilen elektroforezdeki protein fraksiyonlarının dansitometrik görünüşleri.



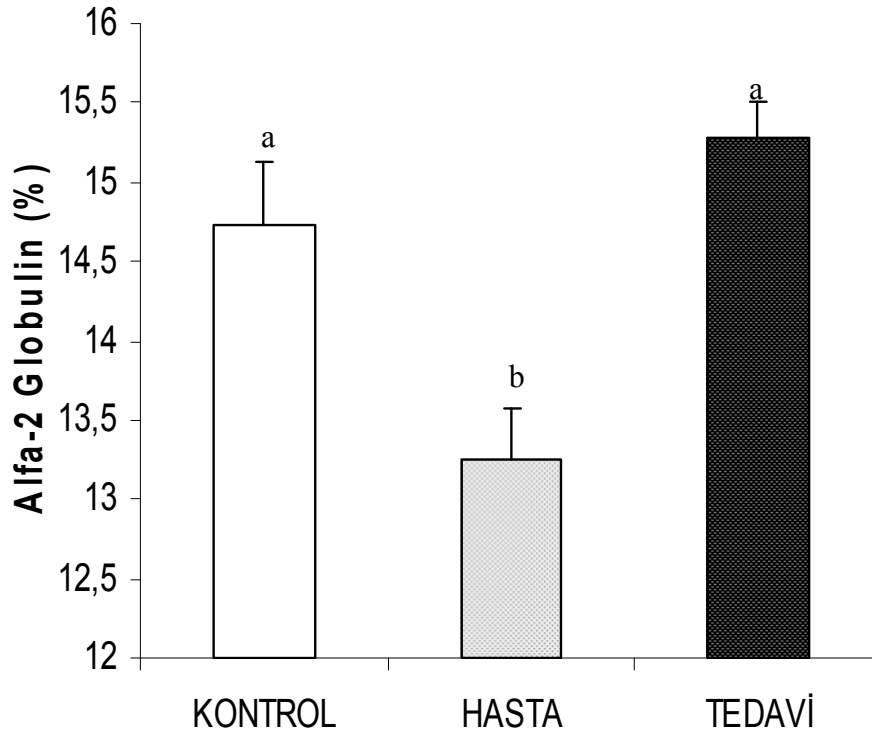
Şekil 11. Kontrol grubu ile hasta ve tedavi sonrası gruptaki ortalama TP düzeylerinin karşılaştırılması ($p<0,01$).



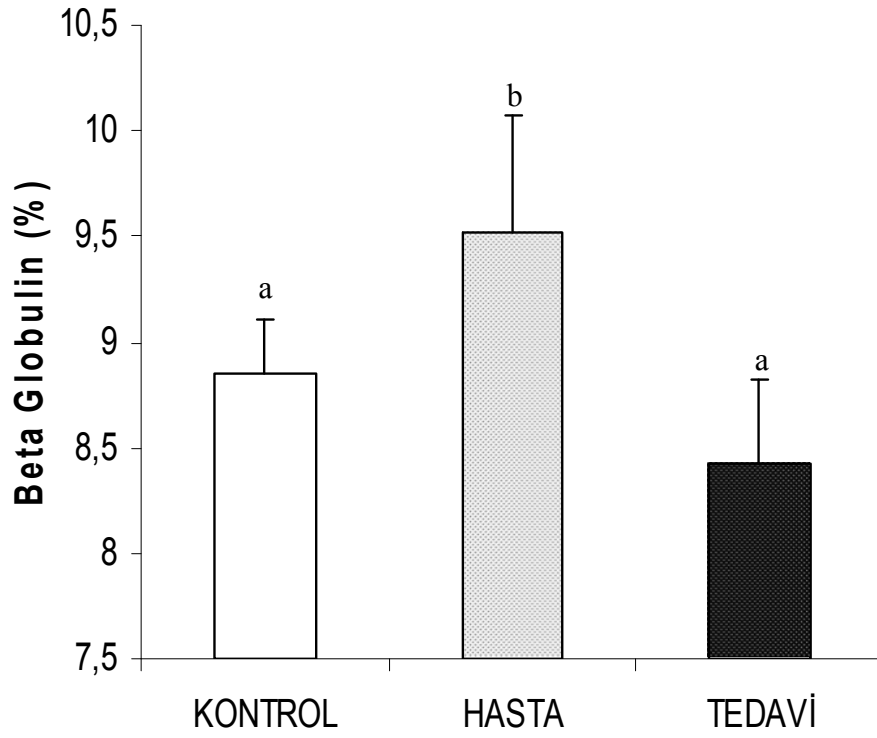
Şekil 12. Kontrol grubu ile hasta ve tedavi sonrası gruptaki ortalama albumin düzeylerinin karşılaştırılması ($p<0,001$).



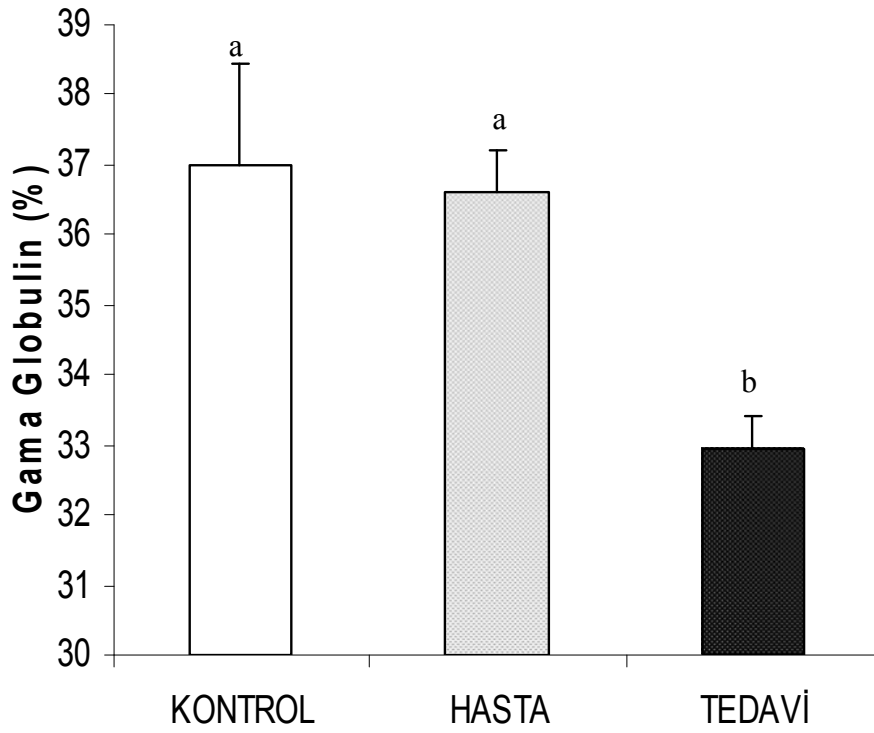
Şekil 13. Kontrol grubu ile hasta ve tedavi sonrası gruptaki ortalama α_1 -globulin düzeylerinin karşılaştırılması ($p<0,01$).



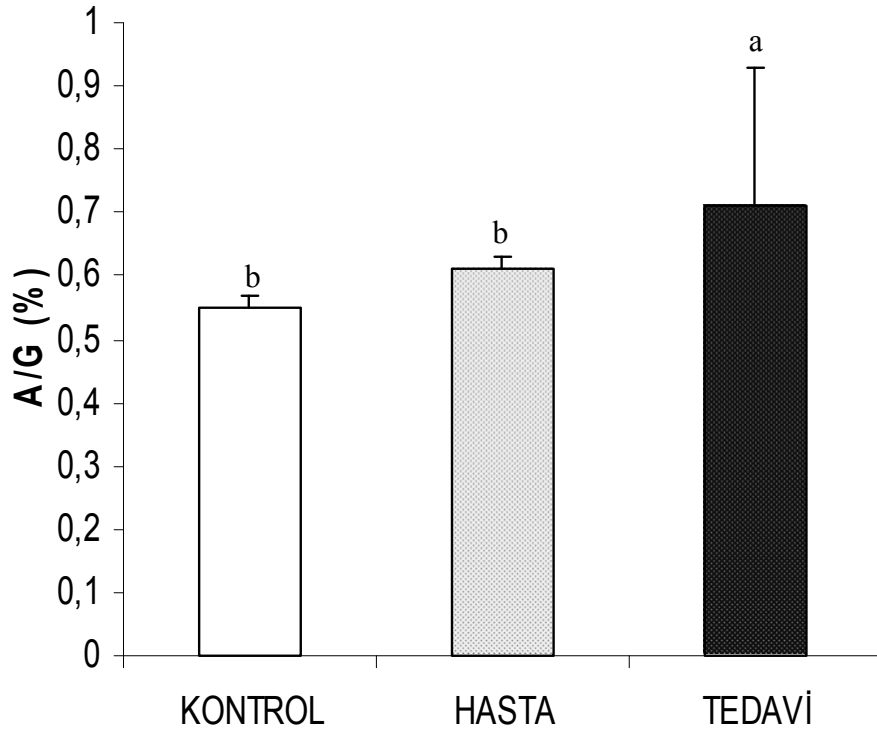
Şekil 14. Kontrol grubu ile hasta ve tedavi sonrası gruptaki ortalama α_2 -globulin düzeylerinin karşılaştırılması ($p<0,001$).



Şekil 15. Kontrol grubu ile hasta ve tedavi sonrası gruptaki ortalama β -globulin düzeylerinin karşılaştırılması ($p>0,05$).



Şekil 16. Kontrol grubu ile hasta ve tedavi sonrası gruptaki ortalama γ -globulin düzeylerinin karşılaştırılması ($p<0,001$).



Şekil 17. Kontrol grubu ile hasta ve tedavi sonrası gruptaki ortalama A/G düzeylerinin karşılaştırılması ($p<0,001$).

5. TARTIŞMA VE SONUÇ

Hekimlikte; hastalıkların teşhisine yönelik muayene yöntemleri arasında biyokimyasal parametrelerin analizi oldukça önemli yer tutar. Organizmadaki proteinlerin rezorbsiyonu, depo edilmesi gibi fonksiyonların meydana geldiği organların çeşitli hastalıklarında, kan serumundaki protein miktarı değişebilir ve disproteinemiler ortaya çıkabilir. Hastalıkların patogenezi, teşhisi, seyri ve prognoz bakımından faydalı sonuçlar elde etmek üzere proteinlerin analizleri için farklı yöntemler bulunmaktadır. Başvurulan yöntemlerden birisi de en çok kullanılan elektroforez tekniklerinden olan selüloz asetat elektroforezidir. Bu teknik insan hekimliğinde kliniklerde 1950’li yıllardan beri kullanılmaktadır. Veteriner hekimliğinde ise yapılan araştırmalar beşeri hekimlikteki kadar fazla değildir (59).

Sağlıklı hayvanlar üzerinde yapılan araştırmalarda Boguth 1953 (60) at, sığır, koyun, keçi ve köpeklerde; Chopard (61) at, sığır, koyun, keçi, domuz, kedi, köpek, ada tavşanı ve tavuklarda; Vignand (62) at, sığır, koyun, keçi, köpek ve domuzlarda; Stöckl (63, 64) at, sığır, domuz, koyun ve tavuklarda kağıt elektroforezi ile kan serum proteinlerini tespit ederek, fraksiyonların bütün evcil hayvanlarda önemli değişiklikler gösterdiğini bildirdiler (59).

Yapılan literatür taramalarında, normal koyunlara ait kan serumu protein fraksiyonlarının değerlerinin araştırmacılara göre (65–68) farklılık gösterdiği saptandı. Diğer taraftan babesiosisli koyunlarda kan serumu protein fraksiyonlarını gösteren bir literatüre rastlanılmadı.

Plazmadaki bütün proteinlerin konsantrasyonları toplamı “total protein” terimi ile ifade edilir. Kanda total protein seviyesindeki nadiren gözlenen yükselmenin (hiperproteinemi) temel nedeni dehidrasyona bağlı su kaybıdır. Buradaki artış, protein sentezindeki artıştan değil, su kaybına bağlı olarak şekillenen nispi bir artıştır. Dehidrasyona yol açan kusma ve ishale seyreden hastalıklar ve diabetik asidozis gibi hastalık durumlarında görülür. Bu tür plazma sıvı hacmindeki azalmaya bağlı şekillenen hiperproteinemilerde plazmadaki protein fraksiyonları arasındaki oranlar bozulmaz.

Mutlak artışlar ise mutlaka patolojik bir nedene dayanır. Şok, dehidrasyon ve bazı tür neoplazmlar (lenfosarkom) total protein artış nedenleridir (69).

Bu çalışmada, serum total protein miktarı kontrol grubunda 5.32 ± 0.42 g/dl iken hasta grupta 3.45 ± 0.22 g/dl'ye düştüğü, tedaviyle birlikte 4.60 ± 0.21 g/dl'ye yükseldiği saptandı. Taiwo ve ark. (70) sağlıklı koyunlarda TP miktarını 7.3 ± 0.3 g/dl, Camaş ve ark. (71) sağlıklı kuzularda bu düzeyi 7.81 ± 0.29 g/100 ml olarak buldu. Literatür bilgileri ile karşılaştırılınca bu çalışmada tespit edilen sağlıklı koyunlardaki TP miktarının düşük olduğu görüldü.

Serum total protein miktarı kontrol grubunda %5.32 g, hasta grupta % 3.45 g, tedavi grubunda % 4.60 g olarak bulundu. Mert ve ark. (3) sağlıklı koyunlarda total protein düzeyini % 6–7.9 g olarak belirtirken, Keay ve ark. (72) agar jel elektroforezi ile koyunlarda TP miktarını % 8.14–7.79 g olarak buldu.

Lobetti (73) babesiosisli köpeklerde serum total proteinlerinin düştüğünü belirtti. Camacho (74) böbrek yetersizliği olan ve *B. annae* ile enfekte köpeklerde TP miktarının sağlıklı köpeklere göre daha düşük olduğunu saptadı. Bu çalışmada, ise babesiosisli koyunlarda TP miktarının düştüğü ve tedaviyle birlikte yükseldiği bulundu. Total protein (TP) düzeyleri hasta grupta düzeyi kontrol grubuna göre önemli oranda ($p < 0.01$) düşük olduğu tedaviyle birlikte yükseldiği ve normal düzeye yaklaştığı görüldü. Hasta grup ve tedavi grubu arasındaki farkın önemli olduğu ($p < 0.01$) saptandı. Bu durum yukarıdaki literatür verileriyle uyumlu bulundu. Ancak, Alani ve ark. (75) *Babesia motasi* ile enfekte koyunlarda total serum protein düzeyinin geçici olarak yükseldiğini ve sonra normale döndüğünü ve kan üre/nitrojen düzeyinin de yükseldiğini tespit etti. Bu durumun hastalık etkeninin *B. motasi* olmasından kaynaklandığı düşünüldü.

Serumda elektroforetik olarak en hızlı giden ve en büyük keskin pik halinde görülen albumin fraksiyonudur. Camaş ve ark. (71) sağlıklı kuzularda albuminin % 66.78 ± 1.70 olarak buldu, White ve ark. tarafından (76) yapılan çalışmada, koyunların serum albumin düzeyi % 5.7 olarak bulundu.

Hailat ve ark. (77) sağlıklı koyunlarda albumini % 40, Taiwo ve ark. (70) 3.3 ± 0.2 g/dl, Keay ve ark. (72) % 3.8 g olarak belirtti, Mert (3) ise % 2.4–3.0 g olarak buldu.

Bu çalışmada albuminin kontrol grubundaki düzeyi 35.29 ± 0.84 , hasta grupta 37.46 ± 0.61 , tedaviyle birlikte 40.60 ± 0.70 'e yükseldi. Tablo 6'da olduğu gibi % g'a çevrildiğinde kontrol grubunda % 1.88 g olan albumin, hasta grupta % 1.29 g'a düştü ve tedaviyle % 1.88 g'a yükseldi.

Serum albumin miktarı incelenirken tedavi sonrası ve babesiosisli gruptaki % olarak tespit edilen düzeyin kontrol grubuna göre yüksek olduğu görüldü. Fakat % g'a göre hasta gruptaki albumin düzeyinin düşük olduğu belirlendi.

Lobetti ve ark. (73) babesiosisli köpeklerde serum albumin düzeyinin düştüğünü saptarken, Springell (78) immün cevaba karşı *Boophilus microplus* ile enfekte edilen babesiosisli sığırlarda plazma albumin düzeyinin arttığını buldu. Ayrıca, Yeruham ve ark. (79) *Babesia bovis* ile enfekte sığırlarda albuminin 3.6 g/dl olduğunu ve bu değer normal koyunlara göre yüksek olduğunu buldu.

Tablo 6'da görüldüğü gibi % g olarak da en düşük albumin düzeyi hasta grubunda saptandı. Total protein düzeylerini etkileyen bütün faktörler albumin düzeylerini de etkiledi.

Albumin düzeyi akut dehidrasyon ve şok durumu hariç nadiren yükselir ve hiperalbuminemi denilen durum şekillenir. Albumin artışı total plazma volümündeki artışla maskelenir. Artan plazma volümü düşük molekül ağırlıklı protein olan albumin ile ilişkilidir. Kan dolaşımında yüksek düzey saptanmıştır. Yüksek onkotik özellikleri ile diğer proteinlerden çok fazla olarak plazma volümünü etkiler. Yani albumin düzeyindeki absolut artış plazma volümündeki artışla sonlanır (45, 80, 81).

Albumin düzeyinin azlığı; protein alımındaki azlık, albumin sentezindeki azalma, yoğun protein yıkımı ve albumin kaybı gibi nedenlerle görülür. Açlık, malnütrisyon, kronik gastrintestinal hastalıklarda emilim ve sindirim bozulduğundan azalma bildirilmiştir (45,80). Kronik karaciğer hastalıklarında albumin sentezi azalmaktadır. Albumin kaybı ise evcil hayvanlarda sıkça gözlenir. Hipoalbuminemi,

yoğun protein yıkımı ile, uzun süreli ateş, kontrol edilememiş diabetes mellitus, travma, insanlarda tirotoksikozis durumlarında gözlenir. Köpeklerde hepatit ve karaciğer sirozunda düşük albumin düzeyi saptanmıştır. Akut nefrit, nefrozis, glomeruler yoğun albuminüri neticesinde şekillenir. Kronik hastalıklarda proteinüriye nadiren rastlanır. Albumin atılımı, sentezindeki defekt ve kullanımının artmasının ortak ilişkileri albumin kaybına neden olur (81, 82). Paraziter hastalıklarda serum albumin düzeyinin azaldığı çeşitli araştırmacılar tarafından bildirilmiştir. Koyunlarda, Haemonchusta hipoalbuminemiye ilaveten hiperglobulinemi de vardır (45, 80, 81).

Bu bilgiler ışığında, bu çalışmada hasta grupta albumin düzeyinin % g olarak azalmasının sebepleri arasında; sentezin önlenmesi veya hızlı yıkımından yahut globulin konsantrasyonunun artmasından ileri geldiği düşünüldü.

Globulin düzeyinde en belirgin azalma, kolostrum almamış yeni doğanlarda gözlenir. Globulinlerin plasental transferrinin olmamasına bağlı olarak yeni doğanlardaki pasif savunma, kolostrumda yüksek düzeylerde bulunan immunglobulinlerin alınmasıyla olur. Protein alımlarındaki noksanlık, özellikle Afrika ülkelerinde protein malnutrisyonlarına bağlı olarak görülen hipoproteinemilerden immuglobulinler de etkilenir ve savunma sistemi zayıflar, enfeksiyonlara karşı direnç düşer. Biyokimyasal açıdan bakıldığında sadece protein alımındaki noksanlıklar değil, bazı vitamin ve iz element noksanlıklarına bağlı olarak da savunma sistemi zayıflar (69).

Globulin düzeylerindeki artış; enfeksiyon hastalıklarında γ -globulin sentezlerinin artmasına bağlı olarak şekillenir. Bakteriyel ve viral hastalıklarda α -globulinin alt ünitesi (α_2 komponenti)'nin plazma düzeyi artar, azalma çok nadirdir. β -globulin miktarında da azalma görülmez, artışları ise genellikle β -lipoprotein artışlarıyla beraber seyreder. γ -globulin düzeyi bakteriyel, viral, paraziter hastalıklarda, hepatosellüler hastalıklarda ve bazı tür neoplazilerde yükselir (69).

Bu çalışmada, serum α_1 -globulin miktarı sağlıklı koyunlarda $\% 2.68 \pm 0.95$, hasta grupta $\% 3.14 \pm 0.11$, tedaviyle birlikte $\% 2.76 \pm 0.06$ normal sınırlara ulaştı. α_2 -globulin miktarının sağlıklı koyunlarda $\% 14.73 \pm 0.39$, hasta grupta $\% 13.26 \pm 0.32$ ve tedaviyle birlikte $\% 15.28 \pm 0.22$ 'ye yükseldiği görüldü.

Camaş ve ark. (71) sağlıklı kuzularda α -globulini % 4.89 ± 0.34 , White ve ark. (76) %11, Hailat ve ark. (77) %10 olarak buldu. Sunulan çalışmada kontrol grubu değerleri yukarıda verilen literatür verilerine göre daha düşük seviyede bulundu.

Tablo 6’da görüldüğü gibi %g’a çevrildiğinde kontrol grubunda % 0.14 g olan α_1 -globulin, hasta grupta % 0.11 g ve tedavi sonucunda % 0.13 g’a ulaştı. α_2 -globulin ise sağlıklı koyunlarda %0.78 g, hastalarda % 0.46 g ve tedavi edildikten sonra % 0.70 g’a yükseldi.

Keay ve ark. (72) agar jel elektroforezi ile sağlıklı koyunlarda α_1 -globulini % 0.42–0.63 g, α_2 -globulini % 0.64–0.71 g buldu. Bu çalışma sonunda tespit edilen α_1 -globulin değerlerinin bu değerlere göre düşük, α_2 -globulinin ise yüksek olduğu saptandı.

Camacho (74) böbrek yetersizliği olan ve *B.annae* ile enfekte köpeklerde globulin fraksiyonlarının sağlıklı köpeklere göre daha düşük olduğunu buldu.

Yeruham ve ark. (79) *Babesia bovis* ile enfekte ve anemi görülen sığırlarda globulin fraksiyonundaki yükselmenin babesia antijenine karşı oluşan immun cevap sonucu oluşan lenfositosisle bağlı olduğunu ileri sürdü.

Sunulan çalışmada babesiosisli koyunlarda α_1 -globulin, α_2 -globulin, β -globulin ve γ -globulin düzeyinde % g olarak düşme tespit edilirken tedaviyle birlikte hasta gruba göre artış tespit edildi. Elde edilen veriler ışığında globulin düzeylerinin değişkenlik nedeninin enfeksiyonun kronik bir hal almış olmasından kaynaklandığı düşünüldü.

Bu çalışma sonucunda elde edilen hasta koyunlardaki protein fraksiyon değerlerinin ortalaması ile normallere ait değerlerin karşılaştırılmasında; albumin değerinin $p<0.001$ güven eşiğinde yükselme, α_1 -globulin’in $p<0.01$ güven eşiğinde yükselme, α_2 -globulin ve γ -globulinin $p<0.001$ güven eşiğinde azalma gözlemlendi. β -globulinin gruplar arasındaki farkı ise istatistiki yönden önemli olmadığı ($p>0,05$) saptandı.

Serum proteinlerinde normalden sapmalar bir grup patolojik olaylar sonunda ortaya çıkmaktadır. Çeşitli enfeksiyon hastalıkları, karaciğer bozuklukları, akut yangısal ve proliferatif olaylar, travma gibi doku bütünlüğüne zarar veren durumlar ve birçok

fizyolojik bozukluklar bunlar arasında sayılabilir. Genellikle hastalıkta en çok göze çarpan değişiklik albumin değerinde düşme olarak belirtilir. Travmalarda α -globulin değeri artmaktadır. Lipoprotein metabolizmasındaki normalden sapmalar da β - globulin fraksiyonunda değişimler meydana getirebilir. Fakat değişikliklerden birçok faktörler sorumlu olduğu için değerlendirilmesi genellikle güçtür (83).

Sonuç olarak;

1. TP düzeyleri, tüm gruplarda normal düzeyden düşük bulundu. Bunun, protein kaybındaki artışın yanı sıra, ırk, çevre ve yaşa ait özelliklerden kaynaklandığı düşünülebilir.
2. Albumin düzeylerinin, hasta grupta % g olarak normal düzeyden düşük bulunmasının nedeni; hastalarda enfeksiyon nedeniyle protein sentezinin azalması veya proteinlerin hızlı yıkımlanmasından ileri gelebilir.
3. α_1 -globulinin hasta gruptaki düzeyi kontrol grubuna göre yüksek, α_2 -globulin düzeyleri kontrol grubuna göre düşük, γ -globulin düzeyi ise tüm gruplarda düşük bulundu. Enfeksiyonun başlangıcında etkili bir sağaltım uygulanmasından dolayı, bağışıklık oluşmadan protozoonlar hastanın kanında bir süre kalıp, sonra kaybolmasının, bu tablonun oluşmasında etkili olduğu fikrine varılabilir.
4. A/G düzeyi globulin konsantrasyonundaki artıştan dolayı yükseldi.
5. Babesiosisli koyunlarda kan serumu protein fraksiyonlarını gösteren bir literatüre rastlanılmadı. Babesiosisli koyunların kan serumu protein fraksiyonlarındaki değişimler eritrositlerdeki hemolizin derecesine göre proteinlerin hızlı yıkılmasına bağlanabilir.

ÖZET

Apaydın B, Babesiosisli koyunlarda serum proteinlerinin elektroforetik incelenmesi. Y.Y.Ü. Sağlık Bilimleri Enstitüsü Biyokimya Anabilim Dalı Yüksek Lisans Tezi, Van, 2006. Ülkemizde hayvanlarda genellikle büyük ekonomik kayıplara neden olan Babesiosis önemli bir sağlık problemidir. Bu çalışma Van yöresindeki koyunlarda görülen Babesiosis hastalığının serum protein fraksiyonları üzerine yaptığı etkileri araştırmak amacıyla planlandı. Çalışmada, canlı materyal olarak Babesiosis hastalığına yakalanmış 1.5–2 yaş arası toplam 36 Akkaraman koyun (hasta grup) kullanıldı. Hasta koyunlar tedavi edilerek tedavi sonrası grubu oluşturuldu. 20 sağlıklı Akkaraman ırkı koyun ise kontrol grubu olarak kullanıldı. Vena jugularis'den usulüne uygun olarak alınan kan örneklerinin serumları ayrıldı ve elektroforez işlemine kadar derin dondurucuda bekletildi. Total protein düzeyleri Biüret metodu, protein elektroforezi ise selüloz asetat kartları kullanarak tayin edildi. TP ($p<0.01$) ve α_2 -globülin'nin hasta gruptaki düzeyi kontrol grubuna göre önemli oranda ($p<0.001$) düşük olduğu, tedaviyle birlikte yükseldiği tespit edildi. Albuminin hasta ve tedavi sonrası gruptaki düzeyi kontrol grubuna göre önemli oranda ($p<0.001$) yüksek olduğu bulundu. α_1 -globülinin hasta gruptaki düzeyi kontrol grubuna göre önemli oranda ($p<0.01$) artarak, tedaviyle birlikte normal düzeye düştüğü görüldü. β -globülin düzeyinde istatistiksel olarak fark bulunamadı. γ -globülinin hasta grupta ve tedavi sonrası grupta önemli oranda ($p<0.001$) azaldığı saptandı. A/G oranının hasta ve tedavi sonrası gruptaki düzeyi kontrol grubuna göre önemli oranda ($p<0.001$) yüksek olduğu bulundu. Babesiosisli koyunların kan serumu protein fraksiyonlarındaki değişimleri eritrositlerdeki hemolizin derecesine göre proteinlerin hızlı yıkılmasına bağlamak mümkün görülmektedir.

Anahtar Sözcükler: Albumin, elektroforez, globulin, koyun, protein

SUMMARY

Apaydın B, Electrophoretical Examination of Serum Protein Fraction of Sheep with Babesiosis. Yüzüncü Yıl University, Health Science Institute, Department of Biochemistry MSci. Thesis, Van 2006. Babesiosis is an important health problem in our country which usually brings on large economic losses in animals. In the present study, the effects of sheep babesiosis on the serum protein fractions were investigated in Van region. In this research, 36 Akkaraman sheep with babesiosis (infected group) between the age of 1.5–2 were used as living material. Infected sheep were cured to make up infected group (BG). 20 healthy Akkaraman sheep (control group) were used. Serums were separated from the blood samples taken from vena jugularis and kept in deepfreeze (-20°C) until electrophoretical analysis. The levels of total proteins were determined by Biuret Method and electrophoresis were performed by cellulose acetate technique. The levels of TP ($p<0.01$) and α_2 -globulin in BG were determined lower than control group (CG) ($p<0.001$) that both were increased with treatment. The concentration of albumin in BG and after treated group (TG) was found higher than the CG ($p<0.001$). The levels of α_1 -globulin in BG were seen higher than the CG ($p<0.01$) and both were decreased to the normal levels after the treatment. The levels of β -globulin weren't determined the difference ($p>0.05$) as statistically. The concentration of γ -globulin in BG and after treated group (TG) was found lower than the CG ($p<0.001$). The concentration of A/G in BG and after treated group (TG) was found higher than the CG ($p<0.001$). The cause of the variation in the blood serum protein fractions of the sheep with babesiosis is the fast destruction of the proteins according to the degree of hemolysis.

Key Words: Albumin, Electrophoresis, Globulin, Protein, Sheep

KAYNAKLAR

1. Alaçam E, Şahal M (1997). Sığır Hastalıkları. Medisan Yayınları, Ankara, 151–153.
2. Gül Y (2002). Geviş Getiren Hayvanların İç Hastalıkları. Medipres Yayınları, Malatya, 266–268.
3. Mert N, Gündüz H, Ekin S (1997). Farklı ırk koyunlarda serum protein düzeylerinin elektroforez ile saptanması. *Y.Y.Ü. Vet. Fak. Derg.* 8 (1–2), 28–30.
4. Ersoy E, Bayşu N (1986). Biyokimya Ders Notları, Ankara Üniversitesi Veteriner Fakültesi Yayınları, Ankara, 174.
5. Mehmetoğlu İ (2002). Klinik Biyokimya Laboratuvarı El Kitabı, İnci Ofset, Konya.
6. Aras K, Ersen G (1987). Klinik Biyokimya, Taş Kitapçılık, Ankara.
7. Williams WJ, Beutler E, Ersleu AJ, Licthman MA (1983). Hematology, 3th Ed, Mc Graw-Hill Book Company, New York.
8. Güralp N, Simms BT (1960). Bionomics of *Fasciola gigantica* in Turkey. *A.Ü. Vet. Fak. Derg. Cilt. VII* No 1–2.
9. Zeybek H (1980). Samsun yöresi koyun ve kuzularında paraziter fauna saptama çalışmaları. *A.Ü. Vet. Fak. Derg.*, 27, 215-236.
10. Güralp N, Simms BT (1964). *Fasciola gigantica* and fascioliasis in Turkey. *Am. J. Vet. Res.*, 25, 104, 196-210.
11. Değer Y (1996). Kan serumundaki biyokimyasal parametrelere (Bazı spesifik karaciğer enzimleri, bakır, kobalt) dayanılarak Van yöresi koyunlarında paraziter invazyonların erken teşhis imkanları ile oluşan anemi şekillerinin ve sebeplerinin araştırılması, Y.Y.Ü. Sağlık bilimleri Enstitüsü Biyokimya Anabilim Dalı Doktora Tezi, Van.
12. Bilal T, Bilal T (2005). Koyun ve Keçilerin İç Hastalıkları ve Beslenmesi, İstanbul Üniversitesi Vet. Fak., İstanbul, 108-110.
13. Mimioğlu M, Göksu K (1969). Veteriner ve Tıbbi Protozooloji II, A.Ü.Vet. Fak., Ankara.
14. Curasson G (1943). *Traité de Protozoologie Vétérinaire et Comparée*. III. Vigot Frères, Editeurs, Paris.
15. Enigk K (1956). Die Schafpiroplasmose in Deutschland. *Dtsch. Tierärztl. Wschr.*, 63, 17/18, 161-162.
16. Tüzdil AN (1936). Mezbahalara Mahsus Parazitoloji, Ahmet İhsan Basımevi, Ltd., İstanbul.
17. Özcan C (1961). Ankara ve civarında evcil hayvanlarda piroplasmose vakaları ve tedavileri üzerinde araştırmalar, Tez, A. Ü. Vet. Fak. Yayınları, 143.
18. Göksu K (1967). Yerli koyunlarımızda Babesidae ve Theileridae'lerin epizootolojik durumlarıyla biyolojilerine dair araştırmalar, Tez, A. Ü. Vet. Fak. Yay., 205.
19. Angelovski t, Petrovic Z and Tomcova D (1963). Piroplasmosis in sheep in Macedonia. *Vet. Glasn.* 17, 861–867 (Ref: Vet. Bull. 34, 6, 329, 1964).
20. Erişim: www.biologie.hu-berlin.de/.../Protozoa%20II.html.

21. İmren HY, Şahal M (1997). Sığır Hastalıkları, Kan ve Kan Yapan Organ Hastalıkları, Ankara Üniversitesi Veteriner Fakültesi, Medisan Yayınları, Birinci Baskı, Bursa.
22. Creighton TE (1990). Protein Structure. Oxford Uni. Press. 23–25.
23. Karlson P (1988). Tıp ve Fen Bilimciler İçin Biyokimya. Çeviri, A. Telefoncu, Arkadaş Yay.
24. Anonim (1994). Biyofizik Ders Notları, İst. Tıp Fak. Basımevi, 25–27.
25. Strayer L (1995). Biochemistry, 4th Ed. WH Freeman, New York.
26. Beşeoğlu N (2002). Serum proteinlerinin iki boyutlu elektroforez ile ayrılması, Sağlık Bilimleri Enstitüsü Biyofizik Anabilim Dalı Yüksek Lisans Tezi, İstanbul.
27. Mert N (1984). Kobay Serum Transferrin'in Saflaştırılması, Karakterize Edilmesi, Sağlık Bilimleri Enstitüsü Biyokimya Anabilim Dalı Doktora Tezi, Ankara.
28. Turgut K (2000). Veteriner Klinik Laboratuar Teşhis, Geliştirilmiş 2.Baskı, Selçuk Üniversitesi Veteriner Fakültesi, 496.
29. Murray RK (2003). Plasma proteins and immunoglobulins, chapter 50, in "Harper's Illustrated Biochemistry" Editors, RK Murray, DK Granner, PA Mayes, VW Radwell, Twenty-sixth Edition, Mc Graw Hill Co., 580-582.
30. Erişim: www.mustafaaltinisik.org.uk/56-1-1-03.ppt (2004).
31. Üstdal K.M. (1976): Türkiye'deki bazı yerli sığır ırklarında hemoglobin, transferrin ve süt proteinlerinin biyokimyasal polimorfizmi üzerine araştırmalar, Doktora Tezi, Ankara.
32. Batmaz H (1988). Sığırlarda perikarditis ve myokarditis travmatikinin ayırıcı tanısında serum protein elektroforezinin önemi üzerine deneysel araştırmalar II, *U.Ü.Vet. Fak. Derg.* 7 (1, 2, 3), 7–11.
33. Hill CR (1991). SCI Biotechnology Group Meeting Analytical Methods in Biotechnology. *J.Chem Tech. Biotechl.* 51,115–140.
34. Iwabuchi S, Yamauchi F (1987). Electrophoretic Analysis of Whey Proteins Present in Soybean Globulin Fractions. *J.Agric Food Chem.* 35, 205–209.
35. Adam B ve Arıçoğlu N (2002) .Klinik Biyokimya Analiz Metotları, Atlas Kitapçılık, Ankara.
36. Reuss FF (1809). Mem. Imp. Des. Naturalists de Moscou, 2, 327. Cite Cann JR (1968). Recent Advances in the Theory and Practice of Electrophoresis. *Immunochemistry*, Pergamon Pres, 5, 107–134.
37. Tiselius A (1937).In Trans- Faraday Soc. 33, 524 Cite Cann JR (1968). Recent Advances in the Theory and Practice of Electrophoresis. *Immunochemistry*, Pergamon Pres, 5, 107–134.
38. Cremer D and Tiselius A (1950). *Biochem.* 2, 320, 273. Cite Cann JR (1968). Recent Advances in the Theory and Practice of Electrophoresis. *Immunochemistry*, Pergamon Pres, 5, 107–134
39. Smithies O (1955). Zone Electrophoresis in Starch Gels. Group Variation in the Serum Proteins of Normal Human Adults, *Biochem. J.* 61, 629–641.
40. Raymond S, Mackanichi M and Aurell B (1962). Acrylamide Gel as an Electrophoresis Medium, *Nature*, 195, 697.
41. Axelsen NH and Kroll J (1973). A Manuel of Quantitative Immuno-electrophoresis. Methods and Applications, *Scand. J. Immunol*, 2, Suppl. 1.

42. Koch J, Schyia D Und Kather L (1970). Ergebnisse der Kontrolle der angegebenen Abstammung von Rindern in der Landestierzucht, *Dtsch. tierarztl. Wschr.*, 77, 249-272.
43. Boyer RF (1986). Modern Experimental Biochemistry. The Benjamin/Commings Publishing Company, 119-138.
44. Lusby ML, Pispath JF, Parrish FC, Robson MR (1983). Effect of Postmortem Storage on Degradation of The Myofibrillar Protein Titin in Bovine Longissimus Muscle. *J.Food Science*, 48, 1787-1790.
45. Mert N (1996). Veteriner Klinik Biyokimya. U.Ü. Vet. Fak. Yayını, 151-153, Bursa.
46. Yenson M (1980). Klinik Biyokimya Laboratuar Çalışmaları. Geliştirilmiş 6.Baskı, 264-271, İstanbul.
47. Zerifi A, Labie C, Benard G (1992). SDS-PAGE Technique for the Species Identification of Cooked Meat. *Fleischwirtschaft* 1, 54-59.
48. Baban N, Siyahhan A (1995). Klinik Biyokimya Protein Metabolizması ve Bozuklukları, Cerrahpaşa Tıp Fak. Yayın No 3918, 126-127.
49. Anderson SC, Cockayne S (1993). Clinical Chemistry, WB Saunders Company, London.
50. Andrews AT(1986). Electrophoresis Theory, Techniques and Biochemical and Clinical Applications, 2nd Ed. Published in the United States by Oxford Universty Pres, New York
51. Horı J (1966). Improved methods of molding starch gel for zone electrophoresis. *Anal Biochemistry*, 16, 234-243.
52. Kathe ST, Kulkarnı BA (1967). Paper electrophoresis of buffalo serum proteins, *Ind. Vet. J.* 44, 303-308.
53. Bollay BM, Edelstein SJ (1991). Protein Methods, Wiley-Liss Company, New York.
54. Hames BD, Rickwood D (1990). Gel Electrophoresis of Proteins, A Practical Approach, 2nd ed. Oxford University Press, New York.
55. Perrett D, Ross G (1991). Capillary zone electrophoresis of nucleotids and nucleosides in blood and urine. *Int. J. Purine and Pyrimidine Res.*, 2, Suppl. 1, 75.
56. Onat T, Kaya E, Sözman EY (2002). İnsan Biyokimyası, Palme Yayıncılık, Ankara, 184-185.
57. Karagül H, Fidancı U.R, Altıntaş A, Sel T (2000). Klinik Biyokimya, Medisan Yayıncılık, Ankara.
58. Sümbüloğlu K, Sümbüloğlu V (1998). Biyoistatistik, Hatipoğlu Yayınevi, Ankara.
59. Ersöz N (1961). Sağlam ve sancı semptomu ile seyreden hasta atlarda kağıtlı elektroforez vasıtasıyla kan serum proteinleri seperasyonları ve kolorimetrik total miktar tayini, Ankara Üniv. Vet. Fak. Yay. 131,5.
60. Boguth W (1953). Papierelektrophoretische Serumuntersuchungen bei Hausssaugetiennen, I. Mitteilung *Zbl. Vet. Med.* 1, 168-187.
61. Chepard P (1954). Bestimmung der Eiweissfraktionen des Blut serums bei den Haustieren mit der Papierelectrophorese unter Berücksichtigung verschiedener Faktoren. *Z. Tierz. Zuck. Biol.* 63, 21-52.
62. Vignand P (1956). Recherches sur l' électrophorese des sérums normaux d'animaux domestiques These, Lyon.

63. Stöckl W, Zacherl MK (1956). Papieelectrophoretische Untersuchungen des serums von rind und Pferd Hoppe. Seyler's Ztschr. F. *Physiolog. Chem.* 293, 278–283.
64. Stöckl W, Zacherl MK (1956). Elektrophoretische serumuntersuchungen bei haustieren unter normalen berdingungen und nact antigenzufuhr. (Mit einem Beitrag über die Wirkunsweize von Adsorbat- vakzinen) wien. *Tierarztl. Mschr.* 43, 150–157, 226–241, 402–430.
65. Chopard P (1954). Bestimmung der Eiweissfraktionen des Blut serums bei den Haustieren mit der Papieelectrophorese unter Berücksichtigung verschiedener Faktoren. *Z. Schweiz. Arch. Tierheilkd.* 96, 252–260.
66. Ketz HA (1959). Die Beduutng und Zusammensetzung der Eiweiss fraktionen im Serum und Plasma beim Schcf. *Arch. Exper. Vet. Med.*, 13, 508–521.
67. Osbaldiston GW (1972). Serum protein fraction in domestic animals. *Br. Vet. J.* 128, 386–693.
68. Tomado I (1962). Paper electrophoretic studies on serum proteins in domestic animals serum proteins in healthy animals. *Jap. J. Vet. Sci.*, 24, 337–348.
69. Tiftik AM (1996). Klinik Biyokimya. Mimoza Yayınları. 155–158.
70. Taiwo VO, Ogunsu AO (2003). Haematology, plasma, whole blood and values of clinically healthy captive-rea grimmia and west African dwarf sheep, I. *Vet. Med. Assoc.*, 58 (1), 3.
71. Camaş H, Ertürk K, Ersoy E (1976). Normal ve musculer dystrophie'li kuzuların kan serumlarında total protein, protein fraksiyonları, kreatinin, kreatin-fosfokinaz, glutamik-pirüvik-transaminaz ve glutamik okzaloasetik- transaminaz yönünden araştırmalar. *Ankara Üniv. Vet. Fak. Derg.* 254–256.
72. Keay G, Doxey DL (1984). Serum protein values from healty ewes and lambs of various ages determined by agarose gel electrophoresis. *British Vet. J.* 140 (1). 85–88.
73. Lobetti RG, Mohr AJ, Dippenaar T, Myburgh E (2000). A preliminary study on the serum protein in canine Babesiosis. *J. South African Vet. Assoc.* 71, 38–40.
74. Camacho AT, Guitian FJ, Palas E (2005). Serum protein response and renal failure in canine Babesia annae infection. *Vet. Res.* 36, 713–722.
75. Alani AJ, Herbert IV (1988). The pathogenesis of Babesia motasi (Wales) infection in sheep. *Vet. Parasitol.* 27 (3–4), 209–220.
76. White A, Hadler P, Smith EL, Stetten D (1954). Principles of Biochemistry. Mc Grow-Hill Book Company, Inc. New York, Toronto, London. 653–656.
77. Hailat NO, Lafi SQ (1998). Adeficiency in the slow moving immunglobulin in Awassi sheep. *Tr. J. Vet. Anim. Sci.* 22, 153–155.
78. Springell PH (1971). The cattle tick in relation to animal production in Australian. Cattle research Laboratory, CSIRO, Division of Animal Genetics, Australia. 7–8.
79. Yeruham I, Avidar Y, Aroch I, Hadani A (2003). Intra-uterine Infection with *Babesia bovis* in a 2-day-old Calf. *J. Vet. Med.*, B 50, 60–62.
80. Koneko JJ (1980). Clinical Biochemistry of Domestic Animals. 3rd Ed. Academic Pres., London.
81. Coles EH (1986). Veterinary Clinical Pathology, 4th Ed. WB Saunders Co., Philadelphia, 146–240.
82. Halliday GJ and Mulligan W (1968). Parasitic hypoalbuminemia, Studies on type II osterdaglasis of cattle, *Res. Vet. Sci.*, 9, 224.

83. Dimopoulos GT (1970). Plasma proteins in clinical biochemistry of domestic animals.(Koneko JJ, Cornelius CE, Ed.), Second Edition, Academic Pres, NewYork and London, Vol. 1, 97–129.

ÖZGEÇMİŞ

1981 yılında Van’da doğdu. İlkokulu Atatürk İlkokulu, ortaokulu İkinisan İlköğretim Okulu, lise öğrenimini Atatürk Lisesi Yabancı Dil Ağırlıklı Lisede Van’da tamamladı. 1999 yılında girdiği Yüzüncü Yıl Üniversitesi Veteriner Fakültesinden 2004 yılında fakülte birincisi olarak mezun oldu. Aynı yıl Yüzüncü Yıl Üniversitesi Veteriner Fakültesinde Biyokimya A.B.D’da Yüksek Lisansa başladı.